



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

“Gestione fitosanitaria eco-compatibile in ambienti agro-forestali e urbani”

DIPARTIMENTO SCIENZE AGRARIE e FORESTALI

SSD AGR/11 (Entomologia generale e applicata)

**Indagini su *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Sicilia:  
Andamento delle infestazioni, valutazione della presenza di nemici  
naturali ed effetti di oli essenziali per il controllo del fitofago**

IL DOTTORE  
**VELLA LEANDRO**

IL COORDINATORE  
**Prof. STEFANO COLAZZA**

IL TUTOR  
**Dott. MIRELLA LO PINTO**

Co-TUTOR  
**Dott. ALFONSO AGRO'**

CICLO \_\_XXVI\_\_  
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO \_\_2016\_\_

## **RINGRAZIAMENTI**

Si ringrazia il Dott. Cusumano Antonino per i suggerimenti e l'aiuto nell'elaborazione statistica dei dati.

Si ringrazia il Dott. Paolo Lo Bue per gli utili consigli per la ricerca e l'allevamento del fitofago.

Si ringrazia il Servizio Agrometeorologico Sicilia (SIAS) per la fornitura dei dati climatici.

Infine un ringraziamento va al Dott. Milco Sinacori per il suo supporto tecnico.

## Riassunto

*Tuta absoluta* è stata segnalata per la prima volta in Italia nel 2008 e in Sicilia nel 2009. Le larve causano mine fogliari e gallerie nei frutti, con conseguenti ingenti danni alle coltivazioni di pomodoro. Il primo capitolo della presente tesi riguarda ricerche condotte per studiarne i livelli di infestazione, l'andamento dei voli dei maschi e rilevarne la presenza di nemici naturali viventi a carico del fitofago in condizioni naturali in un campo nel comprensorio di Naro (AG) C/da Diesi, nel 2013 e 2014. Le varietà di pomodoro utilizzate sono state "Pizzutello" e "Piccadilly". Inoltre, durante i due anni è stato impiantato e mantenuto un allevamento di piante di pomodoro sane e infestate dal fitofago in una serra del Dipartimento SAF dell'Università di Palermo al fine di avere a disposizione materiale fresco per la sperimentazione. Per le catture degli adulti sono state utilizzate trappole a feromone (Zentinel TUAB-4). I dati ottenuti sono stati correlati con le temperature medie della zona fornite dal SIAS (Servizio Informativo Agrometeorologico Siciliano). I risultati hanno mostrato che l'infestazione in campo non è stata costante essendo stata rilevata soltanto in alcuni periodi con bassa presenza di larve sulle foglie. I livelli di infestazione di *T. absoluta* nei due anni di osservazione hanno avuto un andamento variabile in dipendenza dei mesi ma non è stata rilevata correlazione significativa tra le percentuali di infestazione e le temperature medie del periodo. Il monitoraggio dei voli dei maschi ha evidenziato due picchi di catture, uno a luglio e l'altro a settembre 2014, mantenendosi con bassi livelli negli altri mesi. Anche in questo caso l'analisi statistica non ha evidenziato una correlazione significativa tra il numero di catture e le temperature medie. Per quanto riguarda la presenza dei nemici naturali sono stati trovati solo 3 individui: 2 predatori *Macrolophus* sp. (Rinchoia Eteroptera Miridae) e un parassitoide Hymenoptera in corso di identificazione.

Il secondo capitolo della tesi è in relazione alla valutazione dell'azione insetticida e di repellenza di alcuni oli essenziali verso *T. absoluta* **in condizioni di laboratorio**. In natura per la protezione delle piante sono noti gli effetti antibatterici, antivirali, antifungini, insetticidi e anche di repellenza nei confronti di specie fitofaghe. Un primo gruppo di esperimenti di laboratorio ha riguardato l'effetto insetticida provocato dal contatto diretto degli oli di basilico (*Ocimum basilicum* L.), menta piperita (*Mentha piperita* L.), cipresso (*Cupressus sempervires* L.), origano di Spagna (*Corydothymus capitatus* L. Reicheb. f.) e alloro, (*Laurus nobilis* L) su larve di *T. absoluta*, usando la Torre di Potter. Un secondo gruppo di prove ha riguardato la valutazione dell'effetto insetticida per inalazione di alloro, e origano di Spagna a differenti concentrazioni sulle larve usando dei barattoli in vetro dove veniva inserito un dischetto di carta assorbente con olio e poi immerse le larve del fitofago. Un terzo gruppo di prove ha riguardato la stessa azione dei due oli precedenti però sulle uova usando piantine con foglie contenenti uova del fitofago che venivano spruzzate con gli oli. Infine un quarto gruppo di prove ha valutato l'azione dei due oli precedenti in merito all'effetto deterrente l'ovideposizione delle femmine di *T. absoluta* sulle foglie di piantine di pomodoro appositamente allevate. I risultati hanno messo in luce che l'efficacia insetticida maggiore sulle larve è stata mostrata dagli oli di basilico, cipresso e alloro con differenze statistiche significative tra gli oli. La mortalità di larve di *T. absoluta* ottenuta alle diverse dosi per inalazione è risultata crescente al crescere delle quantità di olio essenziale impiegate sia riguardo all'origano sia all'alloro con differenze statistiche significative indicando una correlazione positiva tra dose e mortalità determinata. Al contrario, non è stata rilevata efficacia in merito alle percentuali di schiusa delle uova nelle tesi trattate con i due oli essenziali di origano e alloro che sono risultate elevate. Infine, l'effetto deterrente l'ovideposizione delle femmine sulle foglie, è risultato molto marcato per entrambi gli oli testati.

## Summary

### **Investigations on *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Sicily (Italy): infestation trend, assessment of natural enemies and effects of essential oils for the pest control**

The tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) was reported for the first time in Italy in 2008 and in Sicily in 2009. Larvae produce large foliar mines and galleries on fruits, causing severe damage to the Tomato crops. The first chapter of this study has been characterised through field observations in order to assess infestation levels, fly trend of males and presence of natural enemies living on this pest on 2013 and 2014. The site of the experimental field was Naro (AG) DIESI area using “Pizzutello” and “Piccadilly” varieties of Tomato. During both years *T. absoluta* was reared in a greenhouse of SAF Department of the Palermo (Italy) University. For the captures of males pheromone monitoring traps (Zentinel TUAB-4) were used. All data were correlated with mean temperature provided by Agrometeorological Service of Sicily (SIAS). Results showed that *T. absoluta* infestation in field crop was not constant since it was detected only in some periods with low density of larvae on the leaves. The infestation levels in both years were variable in dependence on months but no significant correlation was found between infestation percentage and mean temperature. Male captures showed two peaks, in July and September 2014, keeping with low numbers in the other months. Statistical analysis showed no significant correlation between the number of male captures and mean temperature. In relation to natural enemies of *T. absoluta* only three individuals were detected inhabiting on field of Tomato crops: two Rinchota Eteroptera predators belonging to Miridae family and one Hymenoptera parasitoid (species not yet identified). The second chapter of this study concerns the assessment of the insecticidal activity and repellent effects of essential oils on *T. absoluta* in laboratory conditions. In nature, essential oils play an important role in the protection of the plants as antibacterial, antivirals, antifungals, insecticides and also against their appetite for such plants. A first laboratory trial was carried out to evaluate the toxicity of *Ocimum basilicum* L., *Mentha piperita* L., *Cupressus sempervirens* L., (*Laurus nobilis* L) and

*Corydothymus capitatus* L. Reichemb. f. on *T. absoluta* larvae sprayed by means the Potter tower. A second group of trials evaluated *Laurus nobilis* L and *C. capitatus* oils at different concentrations using glass jars with oils where larvae are introduced. A third group of experimental trials carried out to evaluate the toxicity of *L. nobilis* and *C. capitatus* oils on *T. absoluta* eggs using plants infested by eggs that were sprayed with oils. Finally a fourth group of tests evaluated *L. nobilis* and *C. capitatus* oils as deterrent effect on oviposition by females on leaves of Tomato plants.

The results have showed that the efficacy insecticide was higher on larvae with oils of *O. basilicum*, *C. sempervires* and *L. nobilis* with significant statistical differences among the oils. The mortality of larvae of *T. absoluta* obtained at different doses for inhalation was increasing with the increase of the amount of essential oil used with significant statistical differences indicating a positive correlation between dose and determined mortality. Conversely, it was not found effectiveness of insecticidal activity on eggs by two oils. Finally, the deterrent effect oviposition by females on the leaves, was very marked for both oils tested.

## INDICE

### I CAPITOLO

INDAGINI SU *TUTA ABSOLUTA* (LEPIDOPTERA:GELECHIIDAE) IN SICILIA:  
ANDAMENTO DELLE INFESTAZIONI, VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DI NEMICI  
NATURALI.

INTRODUZIONE	8
Origine e diffusione	8
L'invasione del bacino mediterraneo: cause e dinamiche	9
Piante ospiti	11
Morfologia dell'insetto	11
Comportamento bio-ecologico	13
Danni	15
Strategia di difesa integrata	16
SCOPO DEL LAVORO	25
MATERIALI E METODI	25
Campo sperimentale	25
Allevamento in serra	27
Attività di campo e laboratorio	29
Analisi statistica	34
RISULTATI	35
LIVELLI D'INFESTAZIONE DI <i>T. ABSOLUTA</i>	35
NEMICI NATURALI TROVATI SU <i>T. ABSOLUTA</i>	41
CONCLUSIONI E DISCUSSIONI	42
BIBLIOGRAFIA	44

## II CAPITOLO

### VALUTAZIONE DELL'AZIONE INSETTICIDA E DI REPELLENZA DI OLI ESSENZIALI VERSO *TUTA ABSOLUTA*

INTRODUZIONE	46
Gli oli essenziali	46
Caratteristiche chimico-fisiche degli oli essenziali	47
Composizione chimica degli oli essenziali	49
Attività insetticida degli oli essenziali	51
Esempi applicativi di sostanze di origine naturale	55
SCOPO DELLA RICERCA	58
MATERIALI E METODI	59
Prove di laboratorio	59
Analisi statistica	66
RISULTATI	67
EFFETTO INSETTICIDA PER CONTATTO SULLE LARVE DI <i>T. ABSOLUTA</i>	67
Trattamenti effettuati con Torre di Potter	67
EFFETTO INSETTICIDA PER INALAZIONE SULLE LARVE DI <i>T. ABSOLUTA</i>	69
EFFETTO DEI TRATTAMENTI CON GLI OLI ESSENZIALI SULLA SCHIUSA DELLE UOVA DI <i>T. ABSOLUTA</i>	72
EFFETTO DETERRENTE L'OVIDEPOSIZIONE	73
CONCLUSIONI E DISCUSSIONI	75
BIBLIOGRAFIA	78



## **I CAPITOLO**

### **INDAGINI SU *TUTA ABSOLUTA* (LEPIDOPTERA:GELECHIIDAE) IN SICILIA: ANDAMENTO DELLE INFESTAZIONI, VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DI NEMICI NATURALI.**

#### **INTRODUZIONE**

##### **Origine e diffusione**

*Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) “minatore fogliare del pomodoro” è uno degli insetti più temibili per le coltivazioni di pomodori sia in pieno campo sia sotto serra.

*Tuta absoluta* è specie di origine neotropica, e al Sud America la sua diffusione è rimasta limitata fino alla metà dello scorso decennio. Descritta sulla base di un singolo esemplare di sesso maschile rinvenuto sulle Ande peruviane (Meyrick, 1917), essa è stata successivamente segnalata in numerosi altri paesi sudamericani (Argentina, Bolivia, Brasile, Cile, Colombia, Ecuador, Paraguay, Uruguay, Venezuela) (Desneux et al. , 2010), in molti dei quali viene riportata quale fitofago di primario interesse a partire dagli anni '80 (Barrientos et al., 1998). La prima indicazione della sua presenza al di fuori del continente di origine risale alla fine del 2006, quando *T. absoluta*.

è stata segnalata in Spagna orientale, nella provincia di Castellón de la Plana (Urbaneja et al., 2007). Da quel momento, la specie ha iniziato una rapida colonizzazione di tutto il bacino del Mediterraneo (Albania, Algeria, Bosnia, Bulgaria, Cipro, Croazia, Egitto, Erzegovina, Francia, Grecia, Israele, Italia, Kosovo, Libia, Malta, Marocco, Montenegro, Portogallo, Romania, Serbia, Spagna, Tunisia), altresì rivelando forte capacità di invasione in tutto il continente europeo (Danimarca, Germania, Gran Bretagna, Lituania, Paesi Bassi, Russia, Svizzera, Ungheria, con

possibile presenza anche in Austria, Belgio, Estonia, Finlandia, Irlanda, Lettonia, Lussemburgo, Polonia, Repubblica Ceca, Slovacchia, Slovenia, Svezia), nell'Africa sub-mediterranea (Sudan) e nel Medio Oriente (Arabia Saudita, Bahrain, Giordania, Iraq, Iran, Kuwait, Libano, Siria, Turchia), dove il lepidottero risulta ancora oggi diffuso (Baniameri, 2011; Bech, 2011; Desneux et al., 2011; Tropea Garzia et al., 2012).

Diversi studi sono stati avviati al fine di individuare le possibili vie di colonizzazione seguite dall'insetto. In particolare, analisi comparative fra popolazioni mediterranee e sudamericane condotte da Cifuentes et al. (2011), non soltanto hanno rivelato omogeneità genetica fra popolazioni presenti negli ambienti di nuova diffusione, ma hanno anche dimostrato analoga variabilità genetica nelle popolazioni mediterranee e in quelle del continente ritenuto d'origine, ipotizzando di conseguenza come il recente processo di invasione del bacino del Mediterraneo e delle regioni limitrofe sia verosimilmente avvenuto a partire da un'unica introduzione dal Sud America. Tale ipotesi, tuttavia, è il risultato di uno studio ancora non completo, basato esclusivamente sulla valutazione di pochi marcatori molecolari (ITS1, ITS2, COI); l'estensione di tali ricerche e l'applicazione di ulteriori marcatori genetici (quali soprattutto i microsatelliti) potranno verosimilmente aprire nuove prospettive alle conoscenze di tale aspetto.

Nelle aree di nuova colonizzazione, il gelechide ha rivelato grande capacità di adattamento a diverse condizioni agro-ecologiche, con elevato potenziale riproduttivo e rilevante dannosità economica, così manifestando, tanto quanto già fatto nel corso degli ultimi decenni in Sud America, il suo carattere di specie invasiva.

In Sicilia la sua presenza è stata rilevata nel 2009 (Tropea et al., 2009).

### **L'invasione del bacino mediterraneo: cause e dinamiche**

Per l'interesse fitosanitario assunto in Sud America, le sue caratteristiche biologiche e l'elevato rischio d'introduzione in Europa e nel bacino del Mediterraneo, da parte dell'European and

Mediterranean Plant Protection Organisation (EPPO) *T. absoluta* era stata già nel 2004 annoverata tra gli insetti da quarantena e inserita nella lista A1 (EPPO, 2005), cioè quella relativa agli organismi nocivi a rischio d'introduzione ma non ancora segnalati nei paesi membri dell'EPPO. A ciò, tuttavia, non è seguito l'inserimento ufficiale della specie negli aggiornamenti degli allegati alla Direttiva 2000/29/EC, concernente le misure di protezione contro l'introduzione e la diffusione nell'Unione Europea di organismi nocivi ai vegetali o ai prodotti vegetali; e questo ha, di conseguenza, impedito la messa in atto di tempestive misure di controllo alle frontiere da parte dei servizi fitosanitari dei diversi paesi, favorendo quindi l'ingresso e la diffusione dell'insetto nella regione mediterranea. Tuttavia, la rapidità della sua diffusione in Europa e nel bacino del Mediterraneo soltanto in poco più di un quinquennio non può trovare spiegazione solo nella fragilità delle barriere fitosanitarie ma in una serie di cause biotiche e abiotiche che ne hanno consentito l'efficace insediamento. Il lepidottero, infatti, può compiere solo modesti spostamenti attivi, dovuti esclusivamente alla capacità di volo degli adulti, e deve, invece, la gran parte della sua diffusione a spostamenti passivi, operati sia da cause naturali, quali il vento, ma soprattutto antropiche, quali il commercio di frutti di pomodoro infestati. In ogni caso, tale prevalente componente passiva della diffusione di *T. absoluta* non può da sola spiegare lo stabile insediamento verificatosi in Europa anche in aree caratterizzate da valori degli indici eco-climatici di distribuzione lontani dai parametri tipici dell'insetto (Desneux et al., 2010). Ciò può lasciare pensare a varie possibili cause del fenomeno, tra le quali, oltre al generico riferimento ai mutamenti climatici in corso, trovano spazio i possibili mutamenti evolutivi nelle caratteristiche biologiche intrinseche della specie, l'assenza negli ambienti di nuova introduzione di nemici naturali co-evoluti con la specie introdotta, o la presenza, negli stessi ambienti, di sistemi intensivi di coltivazione del pomodoro che incrementano le capacità trofiche e riproduttive del nuovo arrivato.

La mancanza di efficaci nemici naturali nelle aree di nuova colonizzazione, congiuntamente alle iniziali difficoltà di applicazione di adeguate misure fitosanitarie, rappresentano senza dubbio cause

di primaria importanza nel conferire a *T. absoluta* un carattere di forte competizione alla sua prima comparsa in una determinata regione. Ne è esempio l'attuale dinamica di diffusione dell'insetto nella regione Mediterranea, che ha seguito una direttiva "ovest- est", con comparsa iniziale nella Penisola Iberica e successiva progressiva invasione, nell'arco di 2-4 anni, della rimanente parte del bacino, fino al Medio Oriente. Allo stato attuale, *T. absoluta* mostra elevata pressione demografica e ingenti livelli d'infestazione nei paesi del Mediterraneo orientale (di più recente colonizzazione), mentre manifesta già livelli di popolazione più contenuti nel Mediterraneo occidentale, dove vari nemici naturali indigeni hanno instaurato relazioni simbiotiche con il nuovo ospite (Urbaneja et al., 2012; Zappalà et al., 2012) e dove, soprattutto, sono state messe a punto iniziali idonee strategie di contenimento delle sue popolazioni.

### **Piante ospiti**

*T. absoluta* è specie oligofaga legata alle solanacee, tra queste il pomodoro (*Lycopersicon esculentum* Miller) sembra essere l'ospite primario, solo saltuariamente può rinvenirsi su altre specie coltivate. (Desneux et al., 2010). Sono stati segnalati, comunque, occasionali attacchi anche a piante di altre famiglie botaniche, *Malva* sp. e in Sicilia in una serra di uva spina (*Physalis peruviana*) (Tropea et al., 2009) fagiolo (*Phaseolus vulgaris*) (EPPO 2009), cavolo (*Brassica oleracea*) (Speranza S., 2009) e Alchechengi (*Physalis peruviana*).

### **Morfologia dell'insetto**

*Adulto* - Grigio con sfumature beige, e caratterizzato, come è abbastanza tipico nei Gelechidi, da ali lungamente frangiate: quelle anteriori sono strette e lanceolate, mentre le posteriori, vagamente sub trapezoidali, presentano l'angolo apicale prominente e digitiforme. Nell'area apicale dell'ala anteriore si osservano, negli individui appena sfarfallati, una serie di strie scure disposte a raggiera su fondo giallo-ocraceo, strie dovute a squame grigie inserite lungo i rami terminali delle nervature

alari; nella metà basale vi è un numero variabile di macule scure, più o meno sfumate e distinte. Come nella gran parte dei Gelechidi, i palpi labiali sono composti da tre articoli, col penultimo rivestito da squame grosse e spesso irte e l'ultimo affusolato e ricurvo verso l'alto, giungente all'altezza del margine superiore degli occhi. I palpi mascellari, composti da quattro segmenti, sono ridottissimi. Le antenne sono semplici ed hanno anellature bianche e nere alternate, ben nette. Tibie e tarsi sono superiormente nerastri con sottili anellature bianche. Gli organi genitali maschili presentano valve di aspetto claviforme appena ricurve, setolose nella parte superiore, con un grosso dente sul lato interno a metà della loro lunghezza. I due sessi possono distinguersi esteriormente, oltre che per la diversa conformazione dei frenuli (composti da un'unica grossa setola nei maschi e da un fascetto di tre setole sottili nelle femmine), per il diverso rivestimento del lato inferiore dell'addome, che si presenta nei maschi bianco sporco con diffuse squamule grigiastre sui lati, nelle femmine bianco candido con quattro serie sub laterali ben nette di linee oblique nere (Sannino & Espinosa, 2010). L'adulto, che ad ali chiuse si presenta di aspetto bastoncellare, e lungo 5-6 mm e ha un'apertura alare di 10-13 mm.

*Uovo* - Ellittico-subcilindrico, con le estremità polari alquanto smussate. Lungo 0,35-0,38 mm e largo 0,22-0,25 mm è di colore bianco brillante o appena giallognolo alla deposizione per tendere al brunastro verso la maturità. Il corion evidenzia a forte ingrandimento una microscultura a maglie reticolari.

*Larva* - Di dimensioni non superiori ai 7-8 mm, presenta colore di fondo gialliccio o verdognolo per quasi tutto lo sviluppo, evidenziando verso la maturità una sfumatura dorsale di tonalità rosata più o meno intensa (solitamente frammentata in macule o in bande trasversali). Il capo, almeno a partire dalla III età, si presenta giallo, annerito sui lati e posteriormente. La placca protoracica, assai caratteristica, è chiara con il solo bordo latero-posteriore castano o nericcio. La placca sopranale è incospicua e pressoché concolore col fondo.

Sullo sclerite prespiracolare (ai lati del protorace), di forma subtriangolare, sono impiantate tre setole laterali (*L1*, *L2*, *L3*). Gli uncini delle pseudo zampe ventrali (sul III, IV, V e VI urite) sono disposti in serie circolare, con elementi (15-20) di grandezza variabile; a partire dalla II età, le corone di uncini tendono ad aprirsi sul lato esterno, tanto che nelle larve di sviluppo avanzato risultano aperte per almeno . della circonferenza. Gli uncini delle pseudozampe anali (sul X e ultimo segmento), sono invece disposti in serie arcuata, in numero di 10-12.

*Crisalide* - Affusolata, lunga 3,8-4,5 mm e larga 1,3-1,5 mm; verdognola appena formata ma subito tendente al nocciola sempre più intenso, poi castana a maturità. Il cremaster, dispositivo atto a facilitare l'aggancio al substrato (soprattutto nella fase dello sfarfallamento), è osservabile sul X segmento addominale; è costituito da una brevissima e tozza spinetta disposta in posizione apico-dorsale e da una serie di 10-11 coppie di setole rigide e uncinatate situate sia sul lato dorsale, in prossimità della spinetta (4 coppie), che sul lato ventrale, ai lati dell'incisione anale (6-7 coppie).

### **Comportamento bio-ecologico**

Come molti altri gelechidi, l'adulto di *T. absoluta* ha abitudini crepuscolari e notturne, restando di giorno nascosto tra la vegetazione o al suolo, con le ali disposte aderenti al corpo e le antenne poggiare sopra; se disturbato spicca brevi voli, zigzaganti e bassi. La temperatura e l'alimentazione influiscono notevolmente sulla longevità dell'adulto,

che vive fino a sei settimane a 15 °C e solo pochi giorni (4-5) a 35 °C. Gli adulti di *T. absoluta* sono in grado di riprodursi già dopo 24 ore dallo sfarfallamento. La fecondità della femmina si aggira mediamente intorno a 100-150 uova, con un minimo di 40 e un massimo di 260 circa. Il periodo di ovideposizione può prolungarsi per una settimana, con un picco tra il terzo e il quinto giorno. Le uova sono deposte sulle parti epigee della pianta in particolare sulla pagina inferiore della foglia, sugli steli e sui frutti immaturi di pomodoro, isolatamente o in gruppi disordinati di 2-5 elementi. Sulle piante piccole vengono preferiti i palchi apicali, mentre sui frutti le ovideposizioni hanno

luogo preferibilmente su quelli ancora verdi e in particolare sul calice (Speranza S., 2009). La durata dello sviluppo embrionale oscilla da un minimo di 4-5 giorni a 30 °C a un massimo di 10-11 giorni a 15 °C. Il limite termico inferiore è di 12 °C, quello superiore è di 35 °C, ma un tasso di mortalità elevato si verifica in corrispondenza dei valori estremi. (Bentancourt *et al.*, 1996), (Imenes *et al.* 1990) registrarono per il completamento dello stadio di uovo una durata di 5-6 giorni. La larva neonata, prima di iniziare lo scavo di una mina, esplora il substrato per diversi minuti (fino a circa 30) per trovare il punto idoneo alla penetrazione. Sulle foglie pratica un foro di 0,15-0,20 mm di diametro e, nutrendosi del solo parenchima, scava una mina lineare e sottilissima, che in seguito si slarga diventando di aspetto vescicoloso. Le gallerie prodotte sui frutti, hanno un diametro non superiore a 1-1,5 mm, e raramente penetrano oltre il centimetro e mezzo di profondità. I fori d'ingresso, se disposti intorno al calice, sono inizialmente poco evidenti, perchè coperti dai sepali, ma diventano in pochi giorni manifesti in quanto l'area interessata infauna precocemente, evidenziando anche un accumulo di escrementi (Sannino, 2012). Durante l'accrescimento le larve possono abbandonare la prima mina (per sovraffollamento o presenza di marciumi) e vagare per un certo tempo sulla pianta alla ricerca di nuovi siti ove completare lo sviluppo. La fase larvale, che comprende normalmente quattro età, ha una durata, variabile soprattutto in rapporto alla temperatura e alla qualità del cibo, oscillante in media da 13 a 37 giorni, con una soglia termica inferiore di sviluppo intorno a 6 °C .

L'elevata densità di popolazione, rallenta la crescita della larva, e può allungare di alcuni giorni la durata di questo stadio. Le larve giunte a maturità scendono al suolo e si incrisalidano nel terreno o sulle foglie morte cadute; meno frequentemente la larva si incrisalida sulla pianta stessa, nella zona del calice o all'interno di una mina, per il completamento di questo stadio, sono necessari 9 e 10 giorni , Imenes *et al.* (1990).

Come altre specie della stessa famiglia, *T. absoluta* non presenta diapausa e le condizioni ambientali influiscono notevolmente sulla sua biologia. Le basse temperature allungano

sensibilmente i tempi di sviluppo e riducono il numero di cicli annui. La durata del ciclo varia dai circa 40 giorni della I e VIII generazione ai 28 giorni della VI generazione, fino a 60 gg per la generazione più tardiva (IX) e a 110 gg per quella svernante (Sannino & Espinosa, 2010). Guenaoui *et al.* (2010) riportano minimi e massimi di durata del ciclo di 29,5 giorni e 18 giorni per temperature medie di 22 e 31 °C, rispettivamente. Barrientos *et al.* (1998) trovarono, invece, per il completamento del ciclo di sviluppo, una durata media di 76 giorni a 14 °C, 49 giorni a 20 °C e 24 giorni a 27 °C.

In Sud America sono state segnalate fino a una dozzina di generazioni l'anno. Lungo il litorale salernitano ne sono state riscontrate da sei a nove, (Sannino & Espinosa, 2010)

## **Danni**

Il danno è praticato dall'attività alimentare delle larve su tutta la parte aerea delle piante. Sulle foglie, le giovani larve scavano delle gallerie (mine) insinuandosi tra le due epidermidi, che, all'inizio hanno un andamento serpentiforme per poi allargarsi in forma di chiazze molto ampie e quindi molto evidenti, differenziandosi, così, da quelle prodotte da *Liriomyza* spp.. All'interno di queste chiazze, digitiformi, se le foglie vengono osservate in controluce, è facile scorgere le larve sviluppatesi all'interno. Talvolta, l'attacco può interessare anche il picciolo fogliare. Sulla parte apicale dei fusti delle piante adulte, le larve scavano delle piccole gallerie discendenti verso il basso che causano molto spesso la perdita della cima o comunque il disseccamento della vegetazione soprastante. Nel fusto il punto di penetrazione delle larve è in genere posizionato all'ascella delle foglie e nei racemi. I frutti possono essere attaccati in qualunque stadio di sviluppo. Sui frutti più sviluppati, le larve penetrano preferibilmente nella zona del peduncolo provocandone il distacco e quindi la caduta, o comunque scavano delle gallerie all'interno del frutto anche in punti diversi rendendolo non commerciabile. Negli organi colpiti, talvolta, si possono manifestare danni indiretti a seguito dell'insediamento di altri patogeni (batteri e funghi).



## **Strategia di difesa integrata**

Per la gestione tattica di un controllo biologico (mediante predatori) gli stadi più critici sono il primo e secondo stadio larvale (Miranda et. al., 1998).

Una razionale difesa del pomodoro in serra e pieno campo, non differisce sostanzialmente dalle linee di difesa contro altri insetti.

L'approccio più corretto, è infatti, quello di integrare assieme i diversi metodi di lotta, considerato anche il fatto che questo parassita è giunto nei nostri areali possedendo già una più o meno elevata resistenza ai diversi principi attivi utilizzati.

### Mezzi fisici

a) Protezione dei Tunnel e delle Serre con le reti antinsetto:

- Posizionamento di reti antinsetto con una densità minima di 16x10 fili al cmq, per schermare tutte le aperture delle serre al fine di impedire l'ingresso degli adulti ;
- Installazione di doppie porte (anticamere);
- Controllo e manutenzione delle tenute della serra.

b) Utilizzo di trappole elettro-luminescenti:

- Questa tipologia di trappole è consigliabile solo in presenza di strutture ermeticamente chiuse con idonee reti o, in caso contrario, all'esterno delle strutture stesse;
- All'interno della serra, posizionare queste trappole una ogni 500-1000 mq, ad una altezza non superiore al metro;
- Al di sotto della trappola va collocato una superficie collata per intercettare gli individui sfuggiti alla trappola stessa.

c) Solarizzazione:

- Per eliminare le crisalidi presenti nel terreno ed interrompere il ciclo biologico, è indispensabile praticare una corretta solarizzazione nel periodo estivo;

Mezzi agronomici

- Utilizzo di materiale vivaistico sano;
- Accurata eliminazione, delle erbe infestanti in particolare delle Solanacee, sia all'interno che all'esterno delle strutture;
- Asportazione degli organi infestati e distruzione tempestiva di tutti i residui colturali, o immediata copertura ermetica con telo in plastica;
- Rotazioni colturali con specie diverse dalle solanacee;

Mezzi biotecnici

a) Monitoraggio con trappole a feromone:

Scopo di individuare la presenza dell'insetto e valutare il rischio potenziale per la coltura.

Numero di trappole: per superfici inferiori a 3500 mq 1 trappola; Per superfici superiori a 3500 mq 2-4 trappole. Ha disponendo le trappole in posizione centrale (serra o pieno campo), ad una altezza non superiore al metro.

E' necessario rilevare le catture almeno una volta alla settimana. Per conoscere l'evoluzione della popolazione della tignola nelle parcelle monitorate, è necessario disporre delle trappole tipo Delta o a capannina. Gli insetti catturati vanno quindi estratti e contati settimanalmente, provvedendo al rinnovo della base invischiata di entrambe le superfici che ormai hanno perso la capacità di cattura.

Il feromone va solitamente sostituito dopo 4-6 settimane.

INDICAZIONI E VALUTAZIONE DEL RISCHIO IN BASE ALLE CATTURE (da Laore, 2010)	
Nessun rischio di attacco	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0 catture settimanali</li> </ul>
Rischio di attacco molto basso o basso	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alle prime catture, posizionamento di trappole per la cattura massale (20-25 per ettaro).</li> </ul>
Rischio di attacco moderato o alto	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Da 3 a 30 catture settimanali;</li> <li>• Posizionamento di trappole per la cattura massale (20-25 per ettaro);</li> <li>• Trattamenti periodici con i prodotti indicati nella difesa chimica.</li> </ul>

b) Utilizzo di trappole ad acqua per la cattura massale;

- Iniziare la cattura massale quando si osservano le prime catture nelle trappole a feromone;
- Posizionare non meno di 2-3 trappole per 1000 mq nelle colture in serra e non meno di 4-5 trappole per 1000 mq nelle colture di pieno campo (in funzione dell'intensità dell'attacco) per il controllo diretto dell'avversità, oppure come attività complementare alle altre strategie di controllo;
- Distribuire in modo uniforme nell'appezzamento le trappole;
- Posizionare le trappole a non più di 1 metro da terra, evitando che vengano coperte dalla vegetazione, ad una distanza una dall'altra di almeno 25 metri.
- Rinnovare il feromone ogni 4-6 settimane.

### Mezzi chimici

Risulta molto complessa, in quanto, la tignola presenta una spiccata tendenza ad acquisire rapidamente delle forme di resistenza alle sostanze attive insetticide risultate efficaci per il suo controllo.

Ai fini della lotta risulta comunque importante:

- Intervenire tempestivamente quando le catture raggiungono le soglie di intervento sopra riportate;
- Alternare prodotti con meccanismo d'azione diversi;
- Utilizzare precocemente prodotti che intervengano sulle uova e sugli stadi giovanili;
- All'interno della strategia complessiva di difesa dai Fitofagi, si suggerisce di utilizzare prodotti selettivi per l'entomofauna utile;
- Non superare il numero dei trattamenti previsti in etichetta per tutto il ciclo di coltivazione del pomodoro.
- E' auspicabile, considerata la potenzialità del parassita di provocare enormi danni produttivi,

che vengano accelerate le procedure di registrazione/estensione per l'utilizzo di diversi insetticidi, già peraltro normalmente impiegati sul pomodoro o altre specie vegetali per il controllo di altri parassiti.

Viene fornita di seguito una tabella esplicativa sulle sostanze attive attualmente utilizzabili in una strategia di controllo integrato del fitofago:

**Principi attivi registrati e utilizzabili specificamente contro *T. absoluta*.**

PRINCIPIO ATTIVO	GRUPPO CHIMICO	INSETTO BERSAGLIO	AZIONE	CARENZA gg	N. TRATTAM. MAX
Spinosad	spinosoidi	Lepidotteri, <i>Tuta absoluta</i>	Larvicida	3	2-3
Indoxacarb	ossidiazine	Lepidotteri, <i>Tuta absoluta</i>	Ovicida Larvicida	3	4
Azadiractina	bioinsetticidi	Lepidotteri, <i>Tuta absoluta</i>	Adulticida Larvicida	3	2-4
Metaflumizone	Semicarbazoni	<i>Heliothis armigera</i>	Adulticida Larvicida	3	4
Chlorantranilprole	antranilammidi	<i>Tuta absoluta</i>	Ovicida Larvicida	3	2-3
Enamectina	avermectine	<i>Tuta absoluta</i>	Ovicida Larvicida	3	3-4

Per applicare una corretta strategia antiresistenza si suggerisce di utilizzare ogni sostanza attiva in una sequenza di due interventi consecutivi su ogni generazione dell'insetto per poi passare ad una sostanza attiva caratterizzata da un diverso meccanismo d'azione.

### Esempio di alternanza di principi attivi

PRINCIPIO ATTIVO	GRUPPO CHIMICO	INSETTO BERSAGLIO	AZIONE	CARENZA gg	N. TRATTAM. MAX
Clorpirifos metile	Fosfororganico	Lepidotteri- nottue	Adulticida	15	
<i>Bacillus Thuringensis</i> *	bioinsetticidi	Lepidotteri vari	Larvicida	3	3

\* il *Bacillus thuringiensis* va usato tenendo conto della sua breve persistenza (2 max 3 giorni).

La lotta nei confronti di questo microlepidottero va naturalmente inserita nell'ambito di una strategia complessiva che comprenda anche il controllo di altre avversità, quali nottue e aleurodidi.

Attualmente, non esiste una soluzione "certa" per questo lepidottero di nuova introduzione, molto prolifico, già ben adattato e particolarmente resistente ai comuni fitofarmaci;

Rimangono obbligatorie, come lotta preliminare, tutte le misure fisico-agronomiche normalmente usate in serricoltura per la prevenzione dei principali insetti dannosi, come le reti e le doppie porte efficacemente posizionate e le altre misure precedentemente descritte. Per la sua biologia e il conseguente sovrapporsi costante dei vari cicli di sviluppo sulla pianta, all' impianto, bisogna adoperarsi con una serie di interventi atti a debellare il parassita specialmente quando esso si sta insediando nella coltura, elaborando strategie che vanno a colpire i vari stadi di sviluppo della Tignola del pomodoro, specialmente negli impianti estivo autunnali dove la prolificità del parassita raggiunge livelli massimi. (Sannino et al., 2010)

#### Nemici naturali

I nemici naturali, attualmente segnalati su *T. absoluta*, risultano essere circa 30 specie di parassitoidi inquadrabili in 13 generi appartenenti a 6 famiglie diverse (Ichneumonidae, Braconidae,

Eulophidae, Elasmidae, Pteromalidae e Trichogrammatidae)(Giorgini et al., 2012). Di queste sono state identificate 16 specie:

- *Agathis fuscipennis* (Zetterstedt), endoparassitoide polifago riportato a carico di numerose famiglie di Lepidotteri per l'Europa .
- *Bracon hebetor* (Say), ad ampia distribuzione Palearctica, è un ectoparassitoide idiobionte altamente polifago.
- *Bracon osculator* (Nees), ad ampia distribuzione Palearctica, è un ectoparassitoide idiobionte gregario altamente polifago, segnalato per l'Italia su *Elachista bisulcella* (Duponchel) ed *E. utonella* (Frey) (Lepidoptera Elachistidae).
- Bracon* (Habrobracon) *nigricans* Szepligeti [=concolorans Marshall; concolor Thomson; mongolicus (Telenga)], ad ampia distribuzione Palearctica. E' un ectoparassitoide generalista a carico di stadi larvali di Lepidotteri e Coleotteri. In Italia (Sardegna) è già stato segnalato su *Phthorimea operculella* (Zeller) (Lepidoptera Gelechiidae).
- *Chrysocharis pentheus* (Walker) è un parassitoide ad ampia distribuzione Palearctica segnalato su diversi fillominatori, prevalentemente Diptera Agromyzidae, ma anche su diversi Lepidotteri e Coleotteri.
- *Diadegma ledicola* Horstmann (Hymenoptera Ichneumonidae) è un endoparassitoide a distribuzione europea, finora segnalato a carico di Lepidotteri Psychidae e Tineidae.
- *Diadegma pulchripes* (Kokujev) (= *turcator* Aubert) (Hymenoptera Ichneumonidae) è un endoparassitoide finora segnalato con livelli di parassitizzazione anche elevati in relazione a *P. operculella* in diversi paesi: Cipro, Creta, Turchia Israele, India e Cina.
- *Diglyphus crassinervis* Erdös è un parassitoide ad ampia distribuzione Palearctica associato a fillominatori (Diptera Agromyzidae).
- *Necremnus sp. neartidius* (Walker) (Hymenoptera Eulophidae) è un ectofago solitario polifago di Lepidotteri fillominatori.

– *Necremnus artynes* (Walker) (Hymenoptera Eulophidae). La biologia è simile a quella della specie precedente. *N. artynes* è stato recentemente segnalato per la Spagna. Rizzo et al. (2011) hanno riportato questa specie anche per la Sicilia. Tuttavia, nel corso dei campionamenti, Zappalà et al. (2011) e Ferracini et al. (2012) hanno ottenuto esclusivamente individui che si differenziano morfologicamente da *N. artynes* e che sono stati trattati come *N. sp. Near artynes*. *N. sp. near artynes* è la specie a più ampia distribuzione sul territorio italiano essendo stata rinvenuta in tutte le regioni monitorate, ad esclusione della Toscana.

– *Neochrysocharis formosa* (Westwood) [= *Closterocerus formosus* (Westwood)] (Hymenoptera Eulophidae) è un endoparassitoide cosmopolita attivo su numerose specie ospiti (Coleoptera, Diptera e Lepidoptera). Già segnalato in Italia su *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera Gracillariidae) e *Holocacista rivillei* Stainton (Lepidoptera Heliozelidae), ha dimostrato un buon potenziale di controllo, avendo causato in Argentina percentuali di mortalità di circa il 5%..

– *Pnigalio soemius s.l.* (Walker) (Hymenoptera Eulophidae) è un ectoparassitoide molto comune, a distribuzione paleartica, segnalato in rapporto a oltre 130 specie di fillominatori e galligeni, anche di notevole importanza economica, degli ordini Coleoptera, Diptera, Lepidoptera ed Hymenoptera. Tuttavia va considerato che allo stato attuale il “concetto tassonomico” di *P. soemius* include un insieme di specie criptiche, alcune polifaghe altre stenofaghe. I reperti ottenuti indicano che gli individui ottenuti da *T. absoluta* appartengono almeno a tre differenti specie criptiche. Le specie riferibili a *P. soemius s.l.* mostrano un’elevata attività di predazione sia allo stadio larvale (host killing) sia allo stadio di adulto (host feeding) e sono quindi dei limitatori di specie fitofaghe potenzialmente molto efficaci.

– *Pnigalio cristatus* (= *Ratzeburgiola cristata*) (Ratzeburg) (Hymenoptera Eulophidae) è una specie europea segnalata a carico di numerosi fillominatori (Coleoptera, Diptera e Lepidoptera).



- *Pnigalio incompletus* (= *Ratzeburgiola incompleta*) (Boucek) (Hymenoptera Eulophidae) segnalato in rapporto a numerosi ospiti fillominatori (Diptera, Lepidoptera e Coleoptera), ma anch'esso probabilmente rappresentato da varie specie criptiche a regime alimentare stenofago.
- *Halticoptera aenea* (Walker) (Hymenoptera Pteromalidae) è un endoparassitoide cosmopolita polifago, prevalentemente associato a Ditteri fillominatori (Agromyzidae).

Per tutte le suddette specie, a eccezione di *N. formosa* e *N. artynes*, le segnalazioni rappresentano una nuova associazione con *T. absoluta*.

Tra i predatori ritrovati, nella parte orientale della Spagna, su *T. absoluta* citiamo *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) e *Nesidiocoris tenuis* Reuter (Hemiptera: Miridae) entrambi predatori di *T. absoluta*, sia su uova che su larve con preferenza dei primi stadi (Urbaneja et al., 2009).

## **SCOPO DEL LAVORO**

Scopo del lavoro è stato quello di individuare e monitorare la presenza di *T. absoluta* in una zona del comprensorio di Naro (AG), valutandone i livelli di infestazione e i danni, e di rilevare la presenza di eventuali nemici naturali (predatori e/o parassitoidi) che svolgono un ruolo di contenimento a carico del fitofago.

## **MATERIALI E METODI**

La ricerca ha avuto una durata di due anni a partire dal mese di Aprile del 2013 sino all'ottobre del 2014. All'inizio di ogni anno si è proceduto all'impianto di un campo sperimentale dove sono state condotte le osservazioni sul fitofago e cercati gli eventuali nemici naturali. Inoltre, è stato allestito un allevamento del fitofago in serra, in modo da avere stadi del fitofago parassitizzabili o idonei alla predazione.

### **Campo sperimentale**

Il campo sperimentale è stato impiantato nel territorio di Naro (AG) C/da Diesi (foto1). L'azienda è situata ad un'altitudine di circa 400 m s.l.m., si estende su una superficie di 21 ha ed è costituita da un unico corpo; per lo studio, nel primo anno, è stata utilizzata una superficie di 2500 m<sup>2</sup> con un investimento di 1300 piante della varietà "Pizzutello", utilizzando un sesto di impianto di 1m x 1,8m.



Foto1 - Campo sperimentale di pomodoro CV Pizzutello  
realizzato nel territorio di Naro (Ag) nel 2013

Nel secondo anno, nel mese di aprile è stata utilizzata una superficie di  $960 \text{ m}^2$  con un investimento di 600 piante della varietà “Pizzutello” e 160 piante della varietà “Piccadilly”, utilizzando un sesto di impianto di  $0,8\text{m} \times 1,6\text{m}$  (foto 2). La coltivazione in pieno campo è stata effettuata con un sistema di irrigazione che seguiva una turnazione di 7 giorni e la raccolta del prodotto è iniziata a fine luglio di ciascun anno.



Foto2 - Campo sperimentale di pomodoro CV Pizzutello e Piccadilly realizzato nel territorio di Naro (Ag) nel 2014

### **Allevamento in serra**

L'allevamento del fitofago è stato realizzato all'interno di una serra in vetro non termocondizionata, di pertinenza del Dipartimento SAF, e in particolare nell'area di Entomologia. Nel primo anno si è proceduto utilizzando piante di pomodoro della varietà "Pizzutello".

Nel mese di aprile sono state trapiantate 100 piantine e poste sotto tunnells realizzati con rete antinsetto, all'interno della serra (foto 3) .

Settimanalmente nove piantine venivano infestate ponendole a gruppi di tre in teche di plexiglass muniti di reti di areazione (foto 4).

Le piantine prima dell'infestazione venivano potate per mantenerle ad un'altezza di 50-60cm; successivamente sono state trapiantate 30 piantine nel mese di agosto, 30 piantine nel mese di settembre e 40 piantine nel mese di ottobre.



Foto 3 – Piantine trapiantate in vasi 12x12 all'interno di tunnel con rete nella serra del dipartimento SAF



Foto 4 - Piantine in teche di plexiglass per l'infestazione nella serra del dipartimento SAF .

Nel secondo anno si è continuato l'allevamento del fitofago su piante di pomodoro della varietà "Pizzutello" all'interno della serra. Nel mese di gennaio sono state trapiantate 104 piantine che periodicamente venivano potate per mantenerle ad un'altezza di 50-60cm; successivamente sono state trapiantate altre 88 piantine nel mese di Marzo, 104 piantine nel mese di maggio e 200 piantine nel mese di ottobre. In entrambi gli anni, per il trapianto sono stati utilizzati vasi 12x12 cm e le piante sono state portate in gabbie con reti allo scopo di limitare possibili infestazioni provenienti dall'esterno e quindi ottenere piante sane (foto 5 e 6).





Foto 5 – Mantenimento delle piante in serra



Foto 6 - Particolare della precedente

L'infestazione delle piantine era mantenuta sia dagli adulti presenti nell'allevamento sia per quelli provenienti dal laboratorio che venivano inseriti a gruppi di 3 coppie all'interno di teche in plexiglass contenenti 3 piante di pomodoro, al fine di ridurre gli effetti della consanguineità.

### **Attività di campo e laboratorio**

Per valutare i livelli d'infestazione in campo a partire dal primo anno sono stati effettuati dei campionamenti di 100 foglie che venivano prelevate a random, con frequenza riportata in tabella 1. Una volta raccolto il campione veniva portato in laboratorio del Dipartimento SAF dell'Università di Palermo, dove veniva osservato allo stereo microscopio, contrassegnando le foglie con segni di infestazione (presenza di mine e/o presenza di larve) (foto 7). Nel secondo anno, inoltre, alla raccolta del prodotto, con cadenza settimanale, venivano osservati 100 frutti (foto 8).



Foto 7 - Foglie con segni di infestazione



Foto 8 - Campione di frutti

Poiché dopo le prime osservazioni del primo anno si è rilevata un'alta mortalità delle larve del materiale proveniente dal campo (foglie infestate), probabilmente dovuta al trasporto, si è preferito, portare nel campo sperimentale di Naro, delle piantine di pomodoro var. "Piccadilly" provenienti dall'allevamento in serra, sicuramente esenti da infestazione che venivano disposte sulle file in modo da interessare l'intero campo (foto 9 e 10), aventi il duplice scopo: 1) ottenere un'infestazione di *Tuta absoluta* 2) trovare eventuali predatori o parassitoidi sulle larve delle piantine infestate. Le piantine venivano sostituite ogni 7 giorni e portate in laboratorio per un'analisi allo stereomicroscopio. Tale tecnica non è stata utilizzata nel secondo anno perché non è stata riscontrata nessuna mortalità delle larve provenienti dal campo. Le larve non parassitizzate venivano prelevate e posizionate su piante sane in modo che potessero continuare ad alimentarsi.



Foto 9 - Piantine esenti da infestazione provenienti dall'allevamento in serra e disposte sulle file in campo

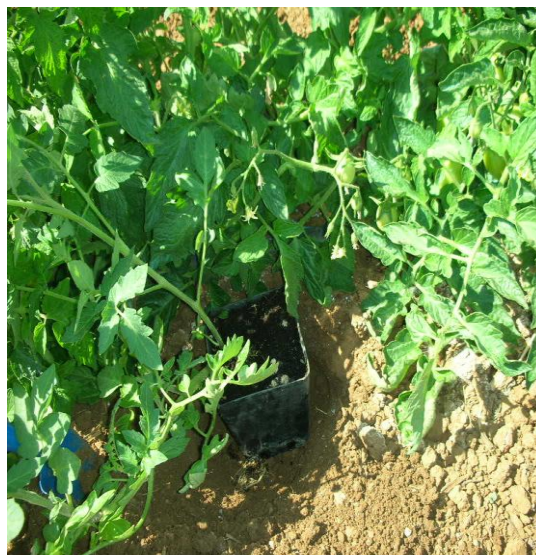


Foto 10 - Particolare della precedente

Per rilevare la presenza degli adulti di *T. absoluta* nel secondo anno nel mese di luglio sono state



Foto 11 - Trappola a feromone sessuale

poste sui filari, esclusi quelli esterni per evitare l'effetto bordo, tre trappole a feromone sessuale (Zentinel TUAB-4) posizionate a triangolo a distanza l'una dall'altra circa 30 m, attaccate a pali tutori e sospese a 1 m d'altezza dal suolo (foto 11).

Al fine di rilevare la presenza di eventuali nemici naturali, a partire dal primo campionamento, effettuato il 10 Maggio del 2013, venivano prelevate le foglie con segni di infestazione e/o con presenza di larve (foto 12). Una volta raccolto il campione veniva portato in laboratorio dove veniva



osservato allo stereomicroscopio e ogni larva allo stadio di 4<sup>a</sup> età veniva posta all'interno di una provetta di vetro (10cm x 1,5cm) dove si lasciava sino al completamento dello sviluppo (foto 13). Le provette venivano osservate giornalmente. All'interno della provetta veniva aggiunta una foglia di olivo, per mantenere l'umidità ed una gocciolina di miele che sarebbe servita successivamente all'adulto neosfarfallato. Gli adulti del fitofago così ottenuti venivano osservati per individuarne il sesso e, le provette venivano separate in dipendenza del sesso dell'adulto al fine di ottenere delle coppie da utilizzare per incrementare e mantenere l'infestazione sulle piantine di allevamento. Le operazioni descritte venivano ripetute con frequenza settimanale.



Foto 12 - Foglie con larve di *T. absoluta*



Foto 13 - Provette contenenti foglie con larve di *T. absoluta*

Nel secondo anno di osservazione le foglie dei campioni venivano poste all'interno di una capsula Petri di vetro di diametro 5,5cm x 1 cm dove era stata aggiunta della vermiculite ed un dischetto di carta assorbente e 2 ml di acqua, per mantenere l'umidità ed una gocciolina di miele che sarebbe servita successivamente all'adulto (foto 14 e 15). Ogni giorno le capsule venivano osservate per rilevare la presenza di nemici naturali. Anche per il secondo anno gli adulti di *T. absoluta* derivanti da larve non parassitizzate venivano separate in dipendenza del sesso in modo da ottenere delle coppie da utilizzare per incrementare e mantenere l'infestazione sulle piantine di allevamento.

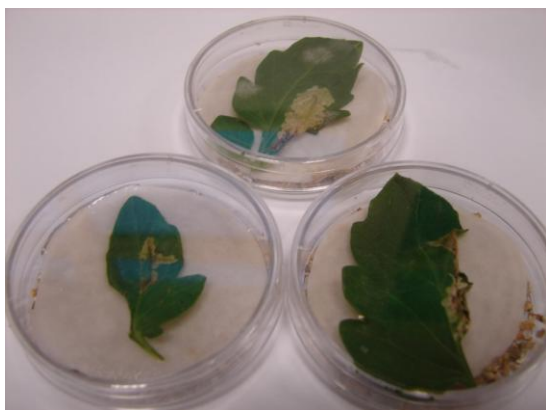


Foto 14 - Capsule Petri contenenti foglie con larve di *T. absoluta*



Foto 15 – Strati all'interno delle capsule Petri contenenti foglie con larve di *T. absoluta*

Inoltre, sempre allo scopo di ottenere eventuali parassitoidi, nel secondo anno, venivano prelevate dal campo con cadenza settimanale porzioni di piante con segni di infestazione e poste in gabbie (cm35x45x55), tenute all'aperto nell'area del dipartimento SAF (foto 16 e 17) e osservate giornalmente. Gli adulti di *T. absoluta* ottenuti servivano per incrementare l'infestazione in serra e aumentare la variabilità genetica.



Foto 16 - Gabbie (cm35x45x55) contenenti porzioni di piante infestate



Foto 17 – Particolare della precedente

### **Analisi statistica**

Per correlare sia le temperature con la percentuale di infestazione di *T. absoluta* sia le catture dei maschi con la percentuale di infestazione è stata utilizzata la regressione lineare (R statistica) sia per le piantine provenienti dalla serra e poste in campo sia per le piante del campo. Il modello di regressione è stato successivamente analizzato con “residual plots” per verificare l’idoneità del modello statistico.

## RISULTATI

### LIVELLI D'INFESTAZIONE DI *T. ABSOLUTA*

Dai campioni di foglie prelevate dal campo sperimentale è stata rilevata infestazione da parte di *T. absoluta* a partire dal mese di giugno 2013 ma non è stata evidenziata presenza di nemici naturali, così come mostra la tabella sottostante:

Tab.1- Esame di campioni di 100 foglie raccolte nel campo sperimentale di NARO (AG) dal 2013) al 2014 per rilevare l'infestazione di *T. absoluta* su piante di pomodoro var. "Pizzutello".

DATA	N° FOGLIE	NON INFESTATE	INFESTATE	LARVE	PARASSITIZZATE	PREDATORI
10/05/2013	100	0	0	0	0	0
25/05/2013	100	0	0	0	0	0
10/06/2013	100	100	2	0	0	0
25/06/2013	100	100	10	0	0	0
02/07/2013	100	100	20	0	0	0
05/06/2014	100	100	0	0	0	0
11/06/2014	100	97	3	3	0	0
18/06/2014	100	96	4	1	0	0
28/06/2014	100	99	1	0	0	0
14/07/2014	100	91	9	4	0	0
22/07/2014	100	100	0	0	0	0
30/07/2014	100	98	2	0	0	0
12/08/2014	100	100	0	0	0	0
18/08/2014	100	100	0	0	0	0
23/08/2014	100	100	0	0	0	0
27/08/2014	100	97	3	3	0	0
30/08/2014	100	100	0	0	0	0
08/09/2014	100	96	4	2	0	1
17/09/2014	100	86	14	6	0	0
27/09/2014	100	85	15	10	1	0
07/10/2014	100	90	10	3	0	0
20/10/2014	100	100	0	0	0	0
27/10/2014	100	100	0	0	0	0

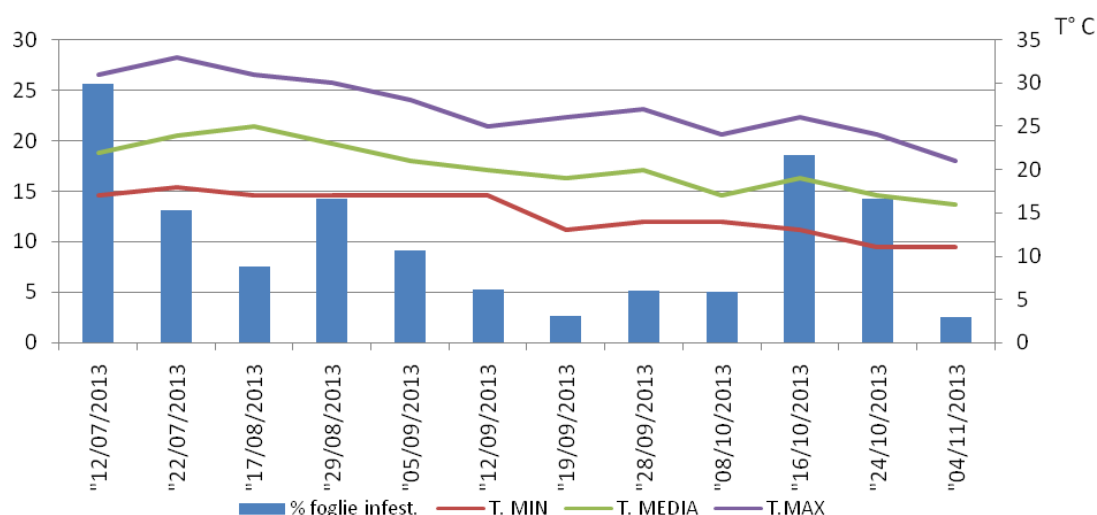
Sulle piante poste in campo e provenienti dalla serra l'infestazione è sempre stata rilevata però con diversa intensità come mostra la tabella 2

Tab. 2 Esame di piante "sentinella" (var. "Piccadilly") (osservazione di tutte le foglie) da luglio a novembre 2013, poste nel campo sperimentale di Naro (AG) per rilevare l'infestazione di *T. absoluta*.

DATA	N° PIANTE	N° FOGLIE	INFESTATE	LARVE	PARASSITIZZATE	PREDATORI
12/07/13	6	390	100	150	0	0
22/07/13	6	380	50	60	0	0
17/08/13	6	400	30	35	0	0
29/08/13	6	350	50	50	0	0
05/09/13	6	330	30	32	0	0
12/09/13	6	380	20	20	0	0
19/09/13	6	380	10	10	0	0
28/09/13	6	390	20	21	0	0
08/10/13	6	360	18	21	0	0
16/10/13	6	350	65	9	0	0
24/10/13	6	350	50	4	0	1
04/11/13	6	390	10	0	0	0

Sulle foglie prelevate dalle piantine collocate tra le file in pieno campo nel periodo di osservazione è stato rilevato un diverso grado di infestazione (fig. 1)

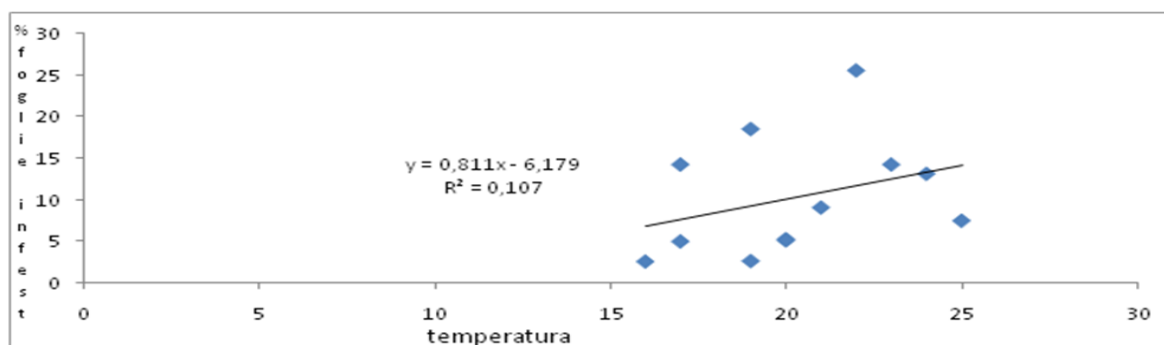
Fig.1 – Percentuale di infestazione di *T. absoluta* su piantine poste periodicamente nel campo sperimentale di Naro (AG) dal 12/07/2013 al 04/11/2013 (temperature dati SIAS)



Ma anche in queste osservazioni non sono state evidenziate tracce di parassitizzazione.

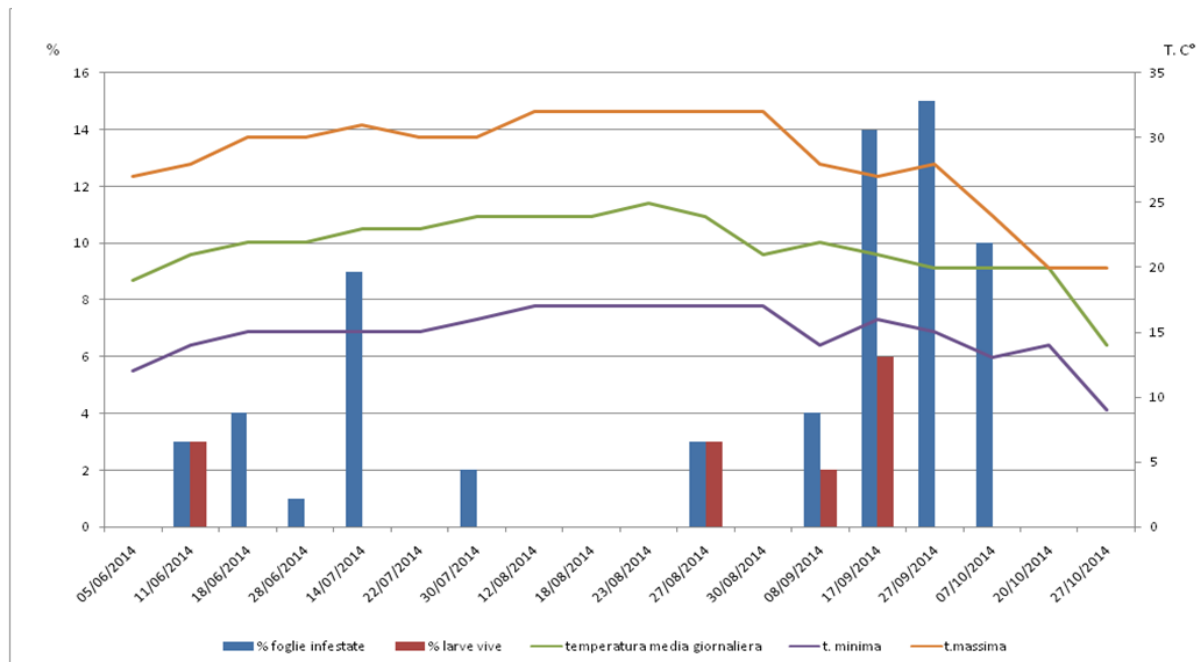
L'analisi statistica non ha evidenziato correlazione significativa tra i livelli di infestazione e le temperature medie rilevate nel periodo di osservazione (fig. 2).

Fig.2 - Correlazione fra la percentuale di foglie infestate da *T. absoluta* su piantine poste periodicamente nel campo Naro (AG) dal 12/07/2013 al 04/11/2013 e le temperature medie (dati SIAS)



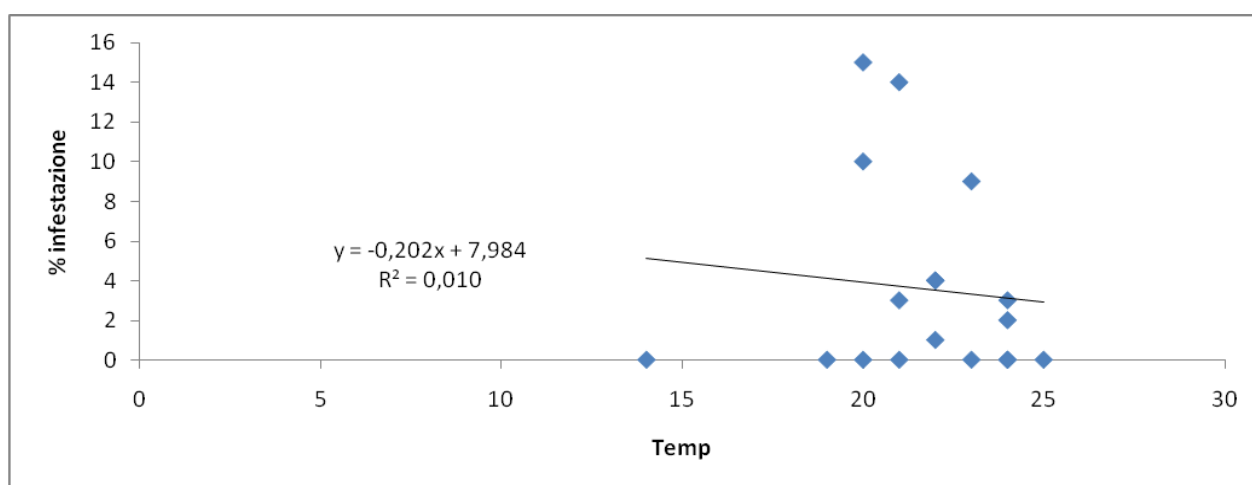
Nel 2014, dai campioni di foglie prelevate dal campo sperimentale, è stata rilevata infestazione di *T. absoluta* a partire dal mese di giugno 2014 (Fig 3).

Fig. 3 andamento dell'infestazione di larve di *T. absoluta* nel campo sperimentale di Naro (AG) dal 05/06/2014 al 27/10/2014 ( temperature dati SIAS).



Anche in questo caso l'analisi statistica non ha evidenziato una correlazione significativa tra l'andamento dell'infestazione di *T. absoluta* e le temperature medie del periodo (fig. 4).

Fig. 4 - Correlazione fra la percentuale di infestazione di *T. absoluta* nel campo di Naro (AG) e le temperature medie (dati SIAS) nel 2014

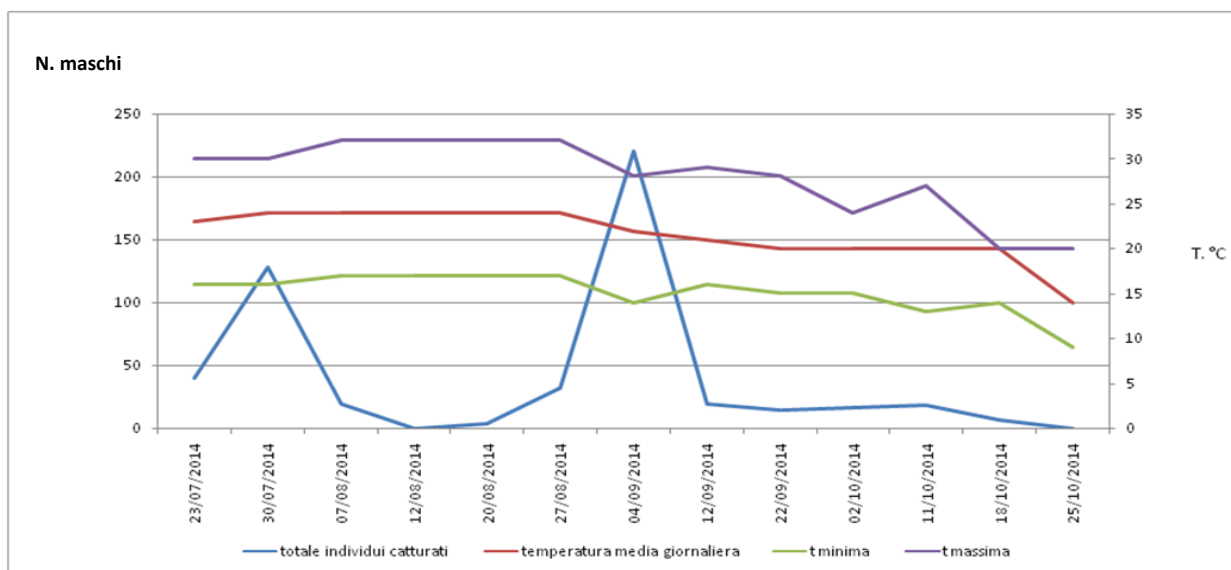


Sui frutti delle varietà Piccadilly e Pizzutello, nei due anni di osservazione non è stata rilevata alcuna infestazione.

Le catture dei maschi di *T. absoluta* ottenute dalle trappole a feromone sono riportate nel figura 5.

In particolare, si osservano due picchi uno a luglio con 128 individui in media e l'altro a settembre con 220 individui in media. Nelle altre date le catture si sono mantenute su livelli molto più bassi.

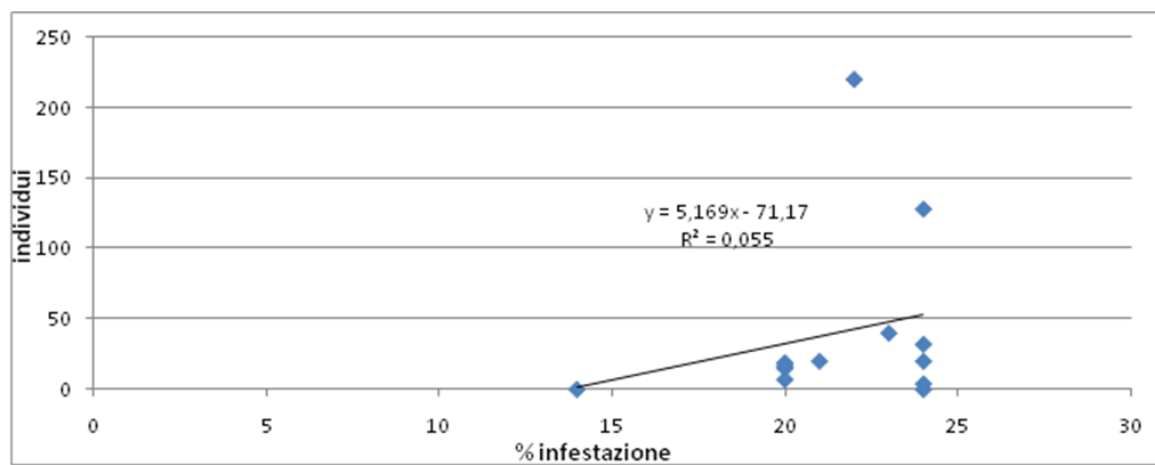
Fig. 5 - Catture di maschi di *T. absoluta* con trappole a feromone sessuale poste nel campo sperimentale di Naro (Ag) nel 2014 (temperature dati SIAS)



L'analisi statistica non ha evidenziato una correlazione significativa tra il numero di catture dei maschi e le temperature medie del periodo di osservazione (Fig. 6)



Fig. 6 – Correlazione tra le catture di maschi di *T. absoluta* con trappole a feromone sessuale e le temperature medie (dati SIAS) rilevate nel campo sperimentale di Naro (AG) nel 2014



## NEMICI NATURALI TROVATI SU *T. ABSOLUTA*

Per quanto riguarda la presenza dei nemici naturali sono stati trovati 3 individui: 2 predatori *Macrolophus* sp. (Rincota Eterottero Miridae) e un parassitoide Hymenoptera in corso di identificazione.

Dei predatori, uno è stato trovato nel mese di ottobre del 2013 sulle piante provenienti dalla serra e poste in campo, l'altro nel mese di ottobre 2014 sulle piante del campo. Il parassitoide è stato trovato nel mese di settembre 2014 sulle osservazioni delle piante fatte in campo



Foto 18 -Predatore *Macrolophus* sp. trovato su *T. absouta* nel 2013



Foto 19 - Parassitoide (Hymenoptera Ichneumonidae) trovato su *T. absoluta* nel 2014

## CONCLUSIONI E DISCUSSIONI

L'infestazione da parte di *T. absoluta*, nelle piantine posizionate in campo, si è rilevata per tutto il periodo di osservazione con un andamento variabile, anche se le temperature non sono oscillate notevolmente; mentre, l'infestazione in campo non è stata costante essendo stata rilevata soltanto in alcuni periodi con bassa presenza di larve sulle foglie. I livelli di infestazione da parte di *T. absoluta* in campo nei due anni di osservazione hanno mostrato una presenza costante con andamento variabile. Infatti, ad un incremento tra giugno metà giugno e metà luglio è seguito un periodo in cui i livelli di infestazione si sono mantenuti bassi per riprendersi a partire dall'inizio del mese di settembre raggiungendo, a metà dello stesso mese, i valori più alti a quelli registrati all'inizio dell'estate. Dall'analisi statistica dei risultati pare che l'andamento delle temperature non abbia avuto un effetto principale sui livelli di infestazione.

Per quanto riguarda le catture dei maschi, nel periodo di osservazione la maggiore presenza di maschi si è rilevata a fine luglio e primi di settembre, con valori superiori a 30 che sembra essere una soglia ad alto rischio mentre nel mese di agosto le catture sono state minime.

Le trappole a feromone possono dare un contributo fondamentale per il controllo della tignola, infatti anche altri autori riportano che il feromone sessuale si è dimostrato fortemente attrattivo nei confronti dei maschi in campo (Michereff Filho et al., 2000; Ferrara et al., 2001). Da qualche anno le trappole a feromone sono state proposte per stabilire le soglie di intervento per il lepidottero (Vercher et al., 2010). Nel Nord della Sardegna gli adulti sono stati rilevati durante tutto l'anno nel 2011 con livelli bassi in inverno e massima presenza in quelli estivi, al contrario dei nostri risultati l'aumento delle catture è stato correlato all'aumento delle temperature (Delrio et al., 2012).

Il ritrovamento di nemici naturali ha riguardato pochissimi individui, probabilmente sia per i bassi livelli di infestazione della *Tuta absoluta* in alcuni periodi dell'anno sia perché queste specie,

essendo polifaghe si spostano su ospiti maggiormente preferiti rispetto alla *T. absoluta*. Infatti è stato riportato che *Macrolophus pygmaeus* è un predatore molto diffuso in Europa la cui azione spesso dipende dalla densità del fitofago (De Baker et al., 2014). Anche i parassitoidi possono trovarsi su *Tuta absoluta* in dipendenza di vari fattori. In Francia ad esempio le larve di *T. absoluta* sono state parassitizzate da quattro specie parassitoidi appartenenti alle famiglie; Braconidae (*Bracon nigricans* Szépligeti), Eulophidae (*Neochrysocharis formosa* (Westwood), *Stenomesus* sp. near *japonicus* e *Necremnus* sp. near *artynes*) (Biondi et al., 2013). Sarà necessario approfondire lo studio su tali specie per valutare il ruolo effettivo di questi nemici naturali nel controllo *T. absoluta*.

## BIBLIOGRAFIA

- Barrientos Z.R., Apablaza H.J., Norero S.A., Estay P.P., 1998. Temperatura base y constante térmica de desarrollo de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). - Ciencia e Investigación Agraria, 25: 133-137.
- Bentancourt C.M., Scatoni I.B., Rodríguez J.J., 1996. Influencia de la temperature sobre la reproducción y el desarrollo de *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera, Gelechiidae). - Revista Brasileira de Biologia, 56 (4): 661-670.
- Biondi, A. ,Chailleux, A., Lambion, J., Han, P., Zappalà, L., Desneux, N. 2013 Indigenous natural enemies attacking *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Southern France. Egyptian Journal of Biological Pest Control Volume 23, Issue 1, 2013, pp 117-121.
- DE BACKER, L. MEGIDO, R.C. FAUCONNIER, M.-L. BROSTAUX, Y. ,FRANCIS, F. VERHEGGEN, F. 2015. *Tuta absoluta*-induced plant volatiles: attractiveness towards the generalist predator *Macrolophus pygmaeus*. Arthropod-Plant Interactions, Vol 9 (5, 9) pp. 465-476.
- Delrio G., Cocco A., Deliperi S. 2012. Prospettive e limiti dell'impiego di feromoni sessuali per la lotta contro la tignola del pomodoro. Atti accademia Nazionale Italiana di Entomologia, pp 103-109.
- Desneux, N., Wajnberg, E., Wyckhuys, K.A.G., Burgio, G., Arpaia, S., Narvaez-Vasquez, C. A., Gonzalez-Cabrera, J., Catalan Ruescas, D., Tabone, E., Frandon, J., Pizzolo, J., Poncet, C., Cabello, T., & Urbaneja, A., 2010: Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. J. Pest Sci.. 83(3): 197-215.
- Eppo 2009. Prima relazione di *Tuta absoluta* in Italia. EPPO servizio di segnalazione , 2 (023):3
- Ferracini C., Ingegno B.L., Navone P., Ferrari E., Mosti M., Tavella L., Alma A., 2012. Adaptation of indigenous larval parasitoids to *Tuta absoluta* in Italy. - J. Econ. Ent., 105:1311-1319.
- Ferrara F.A.A., Vilela E.F., Jham G.N., Eiras A.E., Picanço M.C., Attygalle A.B., Svatoš A., Frighetto R.T.S., Meinwald J., 2001. Evaluation of the synthetic major component of the sex pheromone of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). J. Chem. Ecol., 27: 907-917.
- Giorgini, M., Bernardo, U., Pedara, P.A., 2012. Il complesso dei parassitoidi di *Tuta absoluta* (Meyrick) in Italia. Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia Anno LX, 2012: 77-84.
- Guenauoui Y., Bensaad F., Ouezzani K., 2010. First experiences in managing tomato leaf miner *Tuta absoluta* Meyrick (Lep.: Gelechiidae) in the Northwest area of the country. Preliminary studies in biological control by use of indigenous natural enemies. - Phytoma España, 217:112-113.

Imenes S.D.L., Fernandes M.A.U., De Campos T.B., Takematsu A.P., 1990. Aspectos biológicos e comportamentais da traça do tomateiro *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick, 1917), (Lepidoptera-Gelechiidae). – Arquivos do Instituto Biológico, 57 (1/2): 63-68.

Laore – Agenzia Regionale Per Lo Sviluppo In Agricoltura – Sardegna, 2010. Tignola o falena del pomodoro, riconoscimento e lotta alla *Tuta absoluta*. [www.sardegnaagricoltura.it](http://www.sardegnaagricoltura.it).

Michereff Filho M., Vilela E.F., Attygalle A.B., Meinwald J., Svatoš A., Jham G.N., 2000. Field trapping of tomato moth, *Tuta absoluta* with pheromone traps . J. Chem. Ecol., 26: 875-881.

Miranda, M.M.M., Picanco, M., Zanuncio-Guedes, J.C., 1998. Vita ecologica. (Meyrick) Volume 8, Issue 4.

Potting R., 2009. Pest risk analysis, *Tuta absoluta*, tomato leaf miner moth. Plant protection service of the Netherlands, 24 pp, [www.minlnv.nl](http://www.minlnv.nl)

Sannino L., Espinosa B., 2010. Caratteristiche morfologiche di *Tuta absoluta*. In: *Tuta absoluta*. Guida alla conoscenza e recenti acquisizioni per una corretta difesa (Sannino L. & Espinosa B. eds.), L'Informatore Agrario, 46/2010, Suppl. 1: 17-32.

Sannino, L. 2012. Inquadramento sistematico e aspetti morfo-biologici di *Tuta absoluta* (Meyrick)(Lepidoptera, Gelechiidae). *Atti Acad. Naz. Italiana Entomol*, 60, 67-75.

Speranza S., 2009. Prime segnalazioni di *Tuta absoluta* su fagiolino nel Lazio. Terra e Vita, 46: 14-15.

Tropea Garzia G., Siscaro G., Colombo A., Campo G., 2009. Rinvenuta in Sicilia *Tuta absoluta*. L'InformatoreAgrario, 65 (4): 71.

Urbaneja A., Vercher R., Navarro V., Porcuna J. L., Garcia-Marí F., 2007. La polilla del tomate, *Tuta absoluta*. Phytoma España, 194: 16-24.

Urbaneja, H.,Monto, N. & Molla, O., -2009. Suitability of the tomato borer *Tuta absoluta* as prey for *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis*. J. Appl. Entomol. 133 (2009) 292–296.

Vercher R., C Alabuig A., Felipe C., 2010. Ecología, muestreos y umbrales de *Tuta absoluta* (Meyrick). Phytoma España, 217: 23-26.

Zappalà L ., Bernardo U., Biondi A., Cocco A.,Deliperi S., Delrio G., Giorgini M., Pedata P. ,Rapisarda C., Tropea Garzia G.,Siscaro G., 2012. Recruitment of native parasitoids by the exotic pest *Tuta absoluta* in Southern Italy.-Bulletin of Insectology 65:51-61.

## II CAPITOLO

### VALUTAZIONE DELL’AZIONE INSETTICIDA E DI REPELLENZA DI OLI ESSENZIALI VERSO *TUTA ABSOLUTA*

#### INTRODUZIONE

##### **Gli oli essenziali**

Tra le alternative più interessanti proposte dalla letteratura per la lotta contro gli insetti dannosi alle piante è l’uso di oli essenziali (Abadias et al., 2011, Gutierrez et al., 2009). Il potere insetticida degli oli essenziali è conosciuto da molti anni; in particolare gli oli essenziali di *Melaleuca alternifolia*, *Thymus vulgaris*, *Mentha piperita* e *Rosmarinus officinalis* venivano utilizzati per il trattamento di infezioni batteriche e micotiche (Van Vuuren et al., 2007). È risaputo che da alcune piante è possibile estrarre delle miscele di sostanze organiche volatili conosciute come oli essenziali. Essi sono noti già dall’antichità e sono stati utilizzati per molteplici scopi come la cosmesi e l’alimentazione. Nonostante la diversa composizione chimica degli oli essenziali, essi hanno in comune alcune proprietà antisettiche, antibatteriche, antifungine e antiossidanti generali. Gli oli essenziali sono liquidi oleosi ottenuti da materiale vegetale (fiori, bulbi, foglie, semi, radici, frutti ecc.). Possono essere ottenuti in vari modi (pressione, estrazione con solventi o CO<sub>2</sub> supercritica) ma il metodo più comune è la distillazione con vapore.

Il termine “olio essenziale” fu coniato nel XVI secolo dal medico svizzero Paracelso di Hohenheim, che chiamò “Quinta essentia” uno dei componenti di un miscuglio estratto da una pianta. Si stima che circa 3.000 oli essenziali siano noti, di cui 300 sono commercialmente importanti per le loro innumerevoli proprietà (Burt, 2004). Le proprietà antimicrobiche degli oli essenziali e dei loro componenti sono conosciute già da molto tempo, ma i meccanismi d’azione dei vari composti non sono ancora stati studiati nel dettaglio (Lambert et al., 2001). Considerato l’alto

numero di composti chimici presenti negli oli essenziali è presumibile che la loro attività antimicrobica non sia attribuibile ad uno specifico meccanismo, ma piuttosto ad una serie di azioni che si combinano e si amplificano per effetto di molecole che agiscono in sinergia.

### **Caratteristiche chimico-fisiche degli oli essenziali**

Un composto o un metabolita cellulare può essere definito volatile se si trova alle condizioni normali in forma gassosa o se possiede una elevata pressione di vapore alle condizioni in cui viene usualmente liberato dalla cellula.

Molti composti la cui pressione di vapore non può definirsi elevata, hanno tuttavia un forte impatto organolettico. Queste molecole, definite aromi o composti aromatici, spesso sono stati identificati come componenti degli oli essenziali di piante aromatiche e di estratti usati nella produzione alimentare. Infatti, alcune di queste sostanze aromatiche svolgono un ruolo chiave nei meccanismi di auto difesa di molte piante contro organismi estranei. Nonostante la composizione chimica degli oli essenziali sia molto complessa, è possibile riunire i componenti in alcuni gruppi fondamentali sulla base degli elementi presenti nei composti (Pedretti, 2003):

#### Composti contenenti carbonio e idrogeno:

-idrocarburi monoterpenici (C<sub>10</sub>) alifatici e aromatici insaturi mono e biciclici: limonene, mircene, pinene, canfene, terpinene, sabinene, fellandrene, silverstrene.

-idrocarburi sesquiterpenici (C<sub>15</sub>): cardinene, selinene, umulene, cariofillene, cedrene.

-azuleni: camazulene, eucazulene, gajazulene, vetivazulene.

-idrocarburi diterpenici (C<sub>20</sub>): canforene, cupressene

#### Composti contenenti carbonio, idrogeno e ossigeno:

-alcooli: geraniolo, linalolo, terpineolo, mentolo, nerolo, citronellolo, borneolo, mirtenolo, santalolo, farnesolo.

-aldeidi: aldeide cinnamica, aldeide benzoica, aldeide anisica, vanillina, citrale, citronellale.



-chetoni: carvone, tujone, canfora, mentone, fencone, pulegone.

-eteri: eucaliptolo, safrolo, estragolo, anetolo, apiolo.

-esteri: acetato di linalile, salicilato di metile, acetato di geranile, acetato di bornile, benzoato di benzile, acetato di terpenili.

-acidi organici: acido benzoico, acido cinnamico, acido salicilico, acido cuminico.

-perossidi: ascaridolo

-fenoli: timolo, eugenolo, carvacrolo. I composti fenolici comprendono i flavonoidi, i tannini, le lignine e l'acido salicilico.

Il termine fenolici comprende un'ampia gamma di composti, i quali hanno tutti un gruppo ossidrilico legato ad un anello aromatico. Essi sono presenti in quasi tutte le piante e si possono accumulare in tutte le loro parti (Raven et al., 2002).

#### Composti contenenti carbonio, idrogeno, ossigeno, azoto e zolfo:

-derivati solfocianici e solforati (Pedretti, 2003). Importanza di queste sostanze è la volatilità, cioè la tendenza delle molecole a passare dalla fase liquida dal punto di vista delle proprietà fisiche, in generale si può affermare che all'aumentare del numero di atomi di carbonio della struttura e del peso molecolare, la solubilità in acqua della molecola diminuisce; mentre aumenta quella nei solventi meno polari e nei lipidi. Le caratteristiche di idrofilia e lipofilia sono molto importanti ai fini dell'attività biologica dei composti organici volatili; la solubilità nei grassi consente alle sostanze volatili di solubilizzarsi nelle membrane citoplasmatiche e nelle cuticole cerosi. Caratteristica di estrema alla fase di vapore. È importante conoscere la volatilità non tanto del composto puro quanto delle sue soluzioni acquose. La volatilità è descritta dal coefficiente di partizione. L'aggiunta di soluti come sali e/o zuccheri può cambiare notevolmente la volatilità del composto aromatico dissolto. L'attività biologica (bioattività) delle sostanze aromatiche vegetali, che generalmente si esprime come inibizione o stimolazione di processi metabolici, è estremamente correlate alla loro volatilità. Gli organismi produttori di composti aromatici, per le caratteristiche di

volatilità di questi ultimi, sarebbero in grado di entrare in relazione a distanza con altri microrganismi, senza la necessità di intermediari e con un più ampio raggio di inattivazione. La via gassosa assicurerebbe anche un minor grado di inattivazione (per solvatazione, adsorbimento ed idrolisi) dei composti prodotti (Hutchison, S.A. 1971). Altra caratteristica peculiare dei composti organici volatili, è quella di manifestare la propria attività a concentrazioni molto più basse di quelle che potrebbero avere un pronunciato effetto nutritivo.

### **Composizione chimica degli oli essenziali**

I componenti degli oli essenziali, o meglio delle essenze, sono metaboliti secondari della pianta, cioè sono prodotti del metabolismo che non partecipano direttamente alla crescita e allo sviluppo dell'organismo (Raven et al., 2002). Ogni tipo di olio essenziale ha la sua specifica composizione chimica che varia non solo in base alla specie di pianta da cui l'olio è stato estratto ma in base alle caratteristiche specifiche della pianta da cui l'olio è stato estratto (Pedretti, 2003). I principali costituenti chimici degli oli sono rappresentati da terpeni che sono idrocarburi con formula generale  $(C_5H_8)_n$ .

Essi sono biomolecole costituite da multipli dell'unità isoprenica (sono chiamati anche isoprenoidi), e possono essere lineari, ciclici o entrambi. Essi rappresentano la classe più abbondante di metaboliti secondari, in quanto comprendono più di 22000 composti descritti (Raven et al., 2002). Ogni unità isoprenica è costituita da cinque atomi di carbonio, e viene legata ad altre unità isopreniche in diversi modi. Le varie unità che costituiscono i terpeni possono essere modificate e contenere elementi di versis da carbonio e idrogeno (Hart et al., 2008). I terpeni vengono sintetizzati dalla pianta, a partire da acetato, attraverso un intermedio molto importante, il pirofosfato di isoprenile (Hart et al., 2008). Essendo il più ampio gruppo di sostanze naturali vegetali, i terpeni nelle piante, sono coinvolti in un'ampia varietà di processi, dalla fotosintesi e dalla crescita, alla riproduzione e alla difesa (Hart et al., 2008). Una singola pianta può sintetizzare molti differenti

terpenoidi, in tempi differenti durante il suo sviluppo e localizzati in parti diverse della pianta (Raven et al.,2002).

I terpeni vegetali non solo giocano un ruolo fondamentale nelle piante, ma sono anche impiegati come aromi, fragranze e medicinali (Raven et al., 2002). Come riportato in tabella 1 i terpeni vengono classificati in base al numero di sub-unità (unità isopreniche) contenute nella loro struttura (Hart et al., 2008).

Tab. 1 - Classificazione dei terpeni

<b>Classificazione</b>	<b>Unità isopreniche</b>	<b>Atomi di carbonio</b>
Emiterpeni	1	5
Monoterpeni	2	10
Sesquiterpeni	3	15
Diterpeni	4	20
Sesteterpeni	5	25
Triterpeni	6	30
Tetraterpeni	7	40

Gli oli essenziali contengono in prevalenza monoterpeni e sesquiterpeni che non hanno un peso molecolare alto e proprio per questo a temperatura ambiente sono liquidi. Sono esempi di terpeni il geraniolo, il mentolo, la canfora, il limonene e il pinene. Oltre ai terpeni, tra i componenti degli oli essenziali vi sono anche i fenoli o altri idrocarburi ossigenati. Talvolta sono presenti anche acidi, lattoni (composti chimici la cui struttura è costituita da un estere ciclico) e composti contenenti zolfo o azoto (Pedretti, 2003). La tipologia e la quantità dei componenti dell'olio essenziale ne determinano e ne caratterizzano le proprietà. La varietà e la ricchezza dei composti contribuisce alle caratteristiche peculiari di ciascun olio (Burt, 2004). In alcuni oli essenziali può predominare un solo costituente, in altri non c'è un singolo componente che prevale, ma un equilibrio di vari

composti. Anche i componenti presenti in minime tracce possono influenzare in modo preponderante l'attività biologica dell'olio essenziale stesso (Pedretti, 2003). Dato che i componenti degli oli essenziali sono metaboliti secondari la composizione chimica dell'essenza subisce una forte influenza dell'ambiente esterno (Burt, 2004; Lanciotti et al., 2004). La composizione di un'essenza è influenzata dal clima e in particolare dalla stagionalità (Burt, 2004; Van Vuuren et al., 2007). Altri parametri importanti che influiscono sulla composizione delle essenze sono l'area geografica dove è cresciuta la pianta, l'altitudine (Rota et al., 2008), il tipo di terreno, la presenza di differenti quantità d'acqua, la pendenza del terreno, le modalità di coltivazione e, fattore molto importante, la durata della foto esposizione (esposizione alla luce del sole) infatti, la formazione delle essenze è strettamente legata all'azione della luce e del calore del sole (Burt, 2004).

### **Attività insetticida degli oli essenziali**

Prerequisito essenziale per l'attività insetticida, è il raggiungimento delle cellule target e la solubilizzazione delle molecole nella membrana cellulare. Le sostanze presenti negli oli essenziali hanno natura idrofoba; tuttavia le condizioni tese ad incrementare l'idrofobicità e ad aumentarne la tensione di vapore ne potenziano la bioattività. Generalmente gli oli essenziali che presentano una maggior attività antimicrobica contengono un'elevata percentuale di componenti fenoliche, come carvacrolo, timolo ed eugenolo; ne sono esempio l'origano ed il timo (Gutierrez et al., 2009). I numerosi processi e le sostanze impiegate come agenti antimicrobici possono manifestare la loro attività in uno dei vari modi. I microrganismi vengono infatti inibiti o uccisi secondo un processo letale che inizia in uno specifico sito d'azione e una volta che è stato imposto il processo letale iniziale si instaura un effetto "domino" che può portare alla morte dell'insetto.

Si possono individuare le seguenti modalità d'azione:

Danneggiamento della parete cellulare: la parete cellulare è una struttura importante, in quanto fornisce protezione e partecipa ad alcuni processi fisiologici della cellula. Alcuni agenti possono inibire la formazione

del materiale della parete cellulare degli insetti, con la risultante formazione di una struttura suscettibile a lisi e quindi a morte cellulare.

Alterazione della permeabilità cellulare: la membrana citoplasmatica preserva l'integrità dei costituenti cellulari e assicura il trasporto selettivo delle sostanze nutritive nella cellula. Un danno a questa membrana può avere come effetto l'inibizione dell'accrescimento o la morte della cellula. L'attività antimicrobica dei composti fenolici è attribuibile al loro effetto sulla permeabilità cellulare. Queste sostanze infatti hanno la capacità di annullare la permeabilità selettiva della membrana, permettendo la fuga dei costituenti cellulari. L'azione insetticida di questi agenti può essere correlata con la fuga di azoto e fosforo dalla cellula. Nella membrana batterica risiedono parecchi enzimi e quindi un'alterazione della membrana può influenzare negativamente il funzionamento di questi enzimi.

Alterazione delle proteine e degli acidi nucleici: la sopravvivenza di una cellula è associata alla conservazione delle proteine e degli acidi nucleici. Una condizione o una sostanza che alteri queste molecole, cioè denaturi proteine o acidi nucleici, può danneggiare irreversibilmente la cellula. Temperature elevate provocano ad esempio una denaturazione di questi costituenti cellulari.

Inibizione dell'azione enzimatica: ciascuno dei numerosi enzimi presenti nella cellula rappresenta un potenziale bersaglio per un inibitore. L'inibizione delle reazioni che forniscono energia (ATP) risulta particolarmente dannosa. Alcuni agenti sono in grado di danneggiare i costituenti cellulari in misura tale che essi non sono più in grado di svolgere le normali funzioni metaboliche. Per esempio, l'attività di molti enzimi dipende da uno dei loro componenti, il gruppo solfidrilico. Un agente ossidante può alterare questo gruppo e inattivare gli enzimi.

Antimetaboliti: esistono alcuni casi di inibizione il cui danno iniziale è un'interferenza in una biosintesi specifica. Molti composti essenziali per il metabolismo microbico possono essere bloccati da composti strutturalmente simili al metabolita naturale, ma lievemente diverso da esso. Tali sostanze vengono chiamate antimetaboliti.

Inibizione della sintesi degli acidi nucleici: certe sostanze chimiche sono potenti inibitori della sintesi dell'RNA e del DNA. Due categorie di sostanze inibiscono la sintesi degli acidi nucleici: i composti che interferiscono con la formazione delle unità costitutive degli acidi nucleici, e cioè delle basi azotate, e i composti che interferiscono con la polimerizzazione dei nucleotidi in acidi nucleici. Il ruolo fondamentale del DNA e del RNA nella cellula suggerisce che qualunque interferenza con la loro formazione e funzione danneggia gravemente la cellula.

Una caratteristica importante dei componenti degli oli essenziali è la loro idrofobicità, che gli permette di penetrare nella membrana cellulare incrementandone la permeabilità. Questo può provocare la fuoriuscita di ioni e di molecole dalla cellula e causarne la morte (Burt et al., 2003). Studi condotti su ceppi di *E.coli* e *Salmonella typhimurium* hanno dimostrato che carvacolo e timolo provocano la disintegrazione della membrana cellulare in seguito all'aumento della fluidità del doppio strato lipidico e alla fuoriuscita dalla cellula di protoni e ioni potassio, con un conseguente crollo del potenziale di membrana e l'inibizione della sintesi di ATP.

I componenti degli oli essenziali possono interagire anche con le proteine inserite nella membrana citoplasmatica. Sono stati ipotizzati due possibili meccanismi d'azione: le molecole idrofobiche degli oli possono inserirsi nel doppio strato lipidico e distorcere la membrana, oppure possono verificarsi interazioni fra le molecole lipofile e la parte idrofobica delle proteine di membrana destabilizzandole (Lanciotti et al., 2004). Alcuni studi hanno dimostrato che l'olio essenziale "intero" presenta una maggiore attività antimicrobica rispetto alle singole componenti, suggerendo che i vari composti agiscono in sinergia potenziando la loro attività. Ai composti principali è stata attribuita la massima azione microbica, ciò nonostante i componenti minoritari appaiono

importanti per potenziare la loro attività. Ad esempio, i due componenti principali dell'olio essenziale di origano, carvacrolo e timolo, hanno mostrato un effetto sinergico contro *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Studi condotti su ceppi di *B.cereus* hanno mostrato il sinergismo tra carvacrolo e p-cimene, pare che quest'ultimo, di per se antibatterico molto debole, determini il rigonfiamento delle membrane cellulari in maggior misura rispetto al carvacrolo; questo meccanismo permetterebbe al carvacrolo di essere trasportato con maggior facilità all'interno della cellula (Burt et al, 2003). Moleyar e Narasimham (1992) hanno valutato l'attività dell'eugenolo e della cinnamaldeide riscontrando che i singoli componenti non inibivano la crescita di *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Micrococcus spp.* e *Enterobacter spp.*, mentre una miscela di cinnamaldeide ed eugenolo a 250 e 500 µg/ml rispettivamente, aveva inibito la crescita dei ceppi sopra menzionati.

Le piante aromatiche hanno tessuti specializzati nella secrezione di metaboliti secondari e situati in parti diverse: radici, rizomi, foglie, fiori. I prodotti di secrezione hanno natura chimica diversa tra loro: cristalli di ossalato di calcio, resine, gomme, mucillagini, terpeni, tannini, latici, pigmenti, oli essenziali. Questi ultimi sono i secreti più diffusi ed abbondanti, sono formati da miscele di molecole organiche volatili (cioè che evaporano facilmente a temperatura ambiente), solubili nei solventi organici ed insolubili in acqua, aventi sapore pungente ed odore caratteristico della pianta che li compone (Isman et al., 2006).

Molte sostanze odorose sono presenti nella struttura vegetale sotto forma di glucosidi; successivamente, per scissione di questi, tali sostanze possono entrare in circolo ed essere trasferite nei vari distretti dell'organismo vegetale. Si ritiene che gli oli essenziali abbiano una notevole importanza, nell'attrarre insetti pronubi e nella difesa della pianta stessa. Il processo di estrazione degli oli essenziali, in generale, prevede l'idrodistillazione a pressione ridotta; il materiale vegetale è di norma essiccato al buio, a temperatura ambiente, fino al raggiungimento di una massa costante,

dopodiché è sottoposto a idrodistillazione per due ore con un apparecchio apposito. Successivamente, per conoscere la natura chimica degli oli essenziali, gli estratti ottenuti si sottopongono a gascromatografia abbinata alla spettrometria di massa (GC/EIMS).

### **Esempi applicativi di sostanze di origine naturale**

Di particolare interesse per un potenziale loro impiego in agricoltura sono gli studi per l'identificazione di nuove sostanze estratte da piante e biologicamente attive contro gli insetti; Nicotina (*Nicotina tabacum* L.), pietrine (*Tanacetum cinerarifolium* Trevir.), rotenone (*Derris* spp. *E Lonchocarpus* spp.) sono buoni esempi di composti naturali largamente utilizzati già da diverso tempo per il controllo degli agenti dannosi in agricoltura. Nuovi successi in questo campo sono stati realizzati con le azadiractine (principi attivi estratti dall'albero di neem (*Azadirachta indica* A. Juss)). I recenti sviluppi nel settore, e la tendenza verso il ricorso a soluzioni tecnologiche di derivazione naturale e a basso impatto per l'ambiente e per la salute umana, chiama in causa anche le scienze agrarie, nella ricerca costante di specie vegetali, piante ed essenze, dotate di metaboliti secondari potenzialmente utili per l'applicazione nel settore della lotta contro gli insetti dannosi. Su questo molto è già stato fatto, ma tantissimo resta ancora da fare, e la nuova sensibilità che costituisce il presupposto di questa "rivoluzione verde" ha sicuramente dato un forte stimolo per l'ulteriore approfondimento della ricerca in merito.

L'accresciuta sensibilità verso tematiche quali salute ed ecologia ha aumentato l'interesse per l'effetto biologico di prodotti naturali, come oli essenziali ed estratti di piante (Copping e Menn, 2000; Ogendo et al., 2008, Rozman et al., 2007; Tunç et al., 2000). Tali proprietà sono già conosciute da lungo tempo e non a caso alcune piante aromatiche (*Eucalyptus* e *Ocimum* spp.) vengono utilizzate tradizionalmente in paesi in via di sviluppo per la conservazione di derrate cerealicole (Obeng-Ofori et al, 1998; Santos, 2006).



Numerosi studi hanno riguardato la valutazione dell'effetto tossico e repellente di vari oli essenziali nei confronti di insetti delle derrate; Alcuni lavori (Nerio et al., 2010; Rajendran e Sriranjini, 2008) riportano diversi studi sulle fonti vegetali, sulle modalità d'azione di vari composti e sugli insetti target. Alcuni oli essenziali, quali origano (*Origanum* spp.), rosmarino (*Rosmarinus officinalis* L.), anice (*Pimpinella anisum* L.), cumino (*Cuminum cyminum* L.), eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn), citronella (*Cymbopogon citratus* (DC. ex Nees) Stapf), lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill.), timo (*Thymus vulgaris* L.), salvia (*Salvia officinalis* L.), menta (*Mentha piperita* L.), bergamotto (*Citrus bergamia* Risso & Poit.), finocchio (*Foeniculum vulgare* Mill.) e alloro (*Laurus nobilis* L.) sono stati studiati per il loro effetto tossico come fumiganti contro insetti delle derrate. Shaaya et al. (1997) hanno studiato gli effetti di fumigazioni effettuate con estratti di menta, salvia, origano, basilico, alloro, rosmarino, lavanda e anice contro *Oryzaephilus surinamensis* (L.), *Rhizopertha dominica* (F.), *Sitophilus orza* (L.) e *Tribolium castaneum* (Herbst), riportando come le ultime due specie si siano mostrate le più tolleranti all'esposizione ai vapori. Oli essenziali di origano, rosmarino, anice, cumino e eucalipto sono risultati efficaci contro *Tribolium confusum* du Val ed *Ephestia kuehniella* Zeller (Tunç et al., 2000) se utilizzati come fumiganti. Anche gli oli essenziali estratti da piante appartenenti al genere *Ocimum* (*O. basilicum* L., *O. gratissimum* L.) hanno dimostrato buoni livelli di efficacia nel controllo delle infestazioni di *S. oryzae*, *T. castaneum*, *O. surinamensis* e *R. dominica* (López et al., 2008; Ogendo et al., 2008). Sette piante aromatiche, incluse rosmarino, citronella ed eucalipto, sono risultate efficaci contro *Sitophilus zeamais* (Motsch) (Nerio et al., 2009); lavanda, rosmarino, timo e alloro hanno evidenziato tossicità nei confronti di *S. oryzae*, *R. dominica* e *T. castaneum*. Uno studio recente, inoltre, ha indagato l'effetto repellente di oli essenziali di piante mediterranee (alloro, bergamotto, finocchio, lavanda) contro adulti di *S. zeamais* e *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e larve di *Tenebrio molitor* (L.) (Cosimi et al., 2009).

Tra gli oli essenziali, quelli di origano, alloro, menta, cipresso e basilico sono quelli da me studiati e la loro efficacia è stata comprovata su un ampio range di specie entomatiche, batteriche e fungine. Dušan et al. (2006), Paster et al. (1995), Şahin et al. (2004) e Soylu et al. (2006) hanno valutato le proprietà antimicrobiche di olio essenziale di origano, evidenziandone grandi potenziali verso molte specie di batteri di funghi e lieviti. Hussain et al.(2010) hanno studiato l'efficacia antimicrobica di estratti di specie appartenenti al genere *Mentha*, rivelando come tale effetto sia funzione della stagione di produzione e sia variabile a seconda del target microbico: tutti gli estratti si sono mostrati fortemente inibenti verso le specie gram positive testate (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*), mentre solo alcune delle specie fungine patogene (*Rhizopus solani*, *Aspergillus niger* e *Alternaria alternata*) hanno evidenziato sensibilità.

## SCOPO DELLA RICERCA

L'attenzione crescente rivolta dall'opinione pubblica e dalle istituzioni verso la salute e il rischio chimico in generale sta portando la ricerca ad approfondire sempre più l'utilizzo di sostanze alternative a quelle di sintesi per la lotta contro gli insetti dannosi. Sono diversi gli studi disponibili in letteratura che hanno valutato l'effetto tossico di sostanze di origine naturale verso insetti patogeni. Pertanto lo scopo del seguente lavoro è stato quello di approfondire il campo di ricerca relativo all'applicazione di oli essenziali come mezzo di lotta alternativo alla lotta chimica contro la *Tuta absoluta*. Nello specifico si è cercato di indagare in merito all'efficacia delle proprietà insetticide di alcuni oli come basilico (*Ocimum basilicum* L.), menta piperita (*Mentha piperita* L.), cipresso (*Cupressus sempervires* L.), origano di Spagna ( *Corydothymus capitatus* L. *Reichemb. f.*), alloro, (*Laurus nobilis* L).

Obiettivo del lavoro è stato quello di valutare l'azione insetticida di alcuni oli essenziali sulla mortalità delle uova e delle larve del fitofago dovuta all'effetto di contatto e inalazione e l'eventuale effetto deterrente la deposizione delle uova da parte di *T. absoluta* sulle piante di pomodoro.

## MATERIALI E METODI

Per realizzare le prove sono stati impiegati degli oli essenziali naturali 100% dalla ERBAMEA, prodotti a livello industriale, standardizzati ed utilizzati come integratori alimentari.

### Prove di laboratorio

Un primo gruppo di prove è stato realizzato per verificare il possibile effetto provocato dal contatto diretto degli oli di basilico (*Ocimum basilicum L.*), menta piperita (*Mentha piperita L.*), cipresso (*Cupressus sempervires L.*), origano di Spagna ( *Corydothymus capitatus L. Reichemb. f.*) e alloro (*Laurus nobilis L.*) per ogni prova sono state realizzate tre ripetizioni, con relativo testimone.

Le larve di *T. absoluta* di terza e quarta età, necessarie per le prove, provenivano dall'allevamento condotto in serra, queste ultimi venivano posti all'interno di scatole Petri del diametro di 9 cm su cui era adagiato un dischetto di carta da filtro. In ogni capsula sono state poste 8 larve; seguendo questa metodologia sono stati testati i seguenti oli essenziali:

- 1) basilico (*Ocimum basilicum L.*), alla concentrazione di 200 µl;
- 2) menta piperita (*Mentha piperita L.*), alla concentrazione di 200 µl;
- 3) cipresso (*Cupressus sempervires L.*), alla concentrazione di 200 µl;
- 4) origano di Spagna ( *Corydothymus capitatus L. Reichemb. f.*) alla concentrazione di 200 µl.
- 5) alloro (*Laurus nobilis L.*) alla concentrazione di 200 µ

Per ogni ripetizione è stata preparata una emulsione di 2ml di acqua distillata + Tween 20 (2%) + 200 µl di olio essenziale, e 2 ml di acqua distillata + Tween 20 (2%). per il testimone .

Per le prove , è stata prelevata l'intera quantità 2 ml di emulsione per essere distribuita tramite la Torre di Potter, questo strumento è realizzato in modo da riprodurre lo spruzzo che effettuerebbe un

atomizzatore posto ad una distanza prefissata dalla coltura. Le prove sono state realizzate in condizioni di laboratorio a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e UR del 60-70% (foto 1, 2,3,4 e 5).



Foto 1 - Torre di Potter

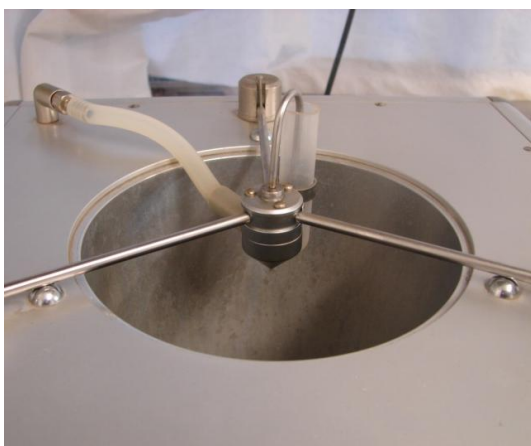


Foto 2 - Alloggiamento per scatola Petri



Foto 3- Diffusore della soluzione



Foto 4 - Capsule con larve di *T. absoluta*

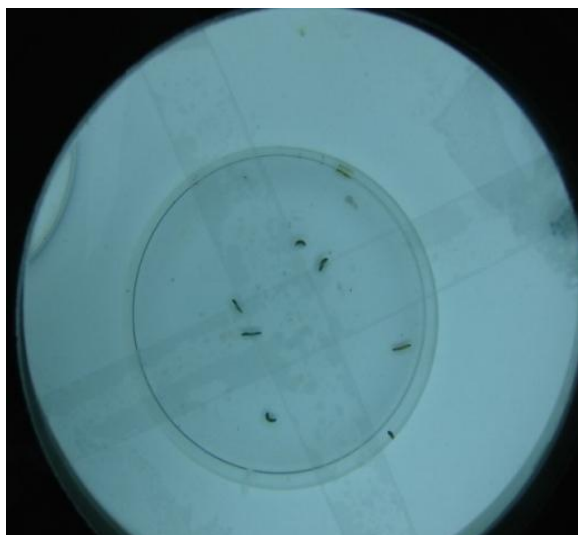


Foto 5 - Capsula all'interno della torre di Potter



Foto 6 - Capsule Petri dopo l'esposizione

Una volta terminata la prova le 8 larve di ogni capsula Petri venivano prelevate e riposte in nuove capsule contenenti sempre un dischetto di carta assorbente, questa operazione veniva effettuata allo scopo di

limitare gli effetti di eventuali vapori rilasciati dalla carta assorbente utilizzata durante la prova, le capsule venivano controllate per 24 ore.

Per ogni tipo di olio essenziale è stato valutato il seguente parametro: -Mortalità (%) calcolata a 24 ore dalla prova.

Un secondo gruppo di prove è stato condotto in maniera simile alla precedente, stavolta però utilizzando dei contenitori in vetro del volume di 600 ml (foto 7) in cui venivano riposti 8 larve. Per ogni prova sono state realizzate due ripetizioni, ciascuna con relativo testimone, è stata preparata

una soluzione di 1 ml di olio essenziale, e 1 ml per il testimone dove è stato utilizzato 1ml di acetone, per entrambe le soluzioni è stata utilizzata l'intera quantità, ed è stata distribuita su un cerchietto di carta assorbente ed inserita in corrispondenza del tappo (foto 8), all'interno del



Foto 7 - Contenitori per la prova.



Foto 8 - Tappo con soluzione di olio essenziale

contenitore al centro è stato cosparso un anello di olio di vasellina per evitare che le larve andassero a contatto con la carta filtro trattata con l'olio essenziale, nella prova si è voluto verificare la mortalità provocata dall'effetto dei vapori sprigionati dai singoli oli essenziali.

Per ogni tipologia di prodotto, alle diverse concentrazioni è stata valutata la mortalità calcolata a 12 h dalle prove.

Con questa metodologia sono stati testati i seguenti prodotti:

- 1) alloro, (*Laurus nobilis* L) alle concentrazioni di 20, 100, 125, 150, 175, 200  $\mu$ l;
- 2) origano di Spagna ( *Corydothymus capitatus* L. *Reichemb. f.*) alle concentrazioni di 0,5, 1, 3, 5, 20  $\mu$ l.

Un terzo gruppo di prove di laboratorio, ha riguardato l'azione ovicida di due oli essenziali in condizioni di semicampo.



Foto 9 - Pianta preparata per la prova

Tali saggi sono stati effettuati utilizzando delle piantine di pomodoro della varietà “Pizzutello” allevate all'interno della serra in vasi 7x7 cm ed mantenuti ad un'altezza di 30-40 cm (foto 9)

I biosaggi hanno previsto l'infestazione controllata con adulti di *T. absoluta*. Le piantine venivano prelevati dall'allevamento e trasferiti all'interno di teche in plexiglass dove venivano esposte alla deposizione (foto 10) di due coppie di *T. absoluta* e per 36 ore . Per ogni ripetizione è stata preparata una emulsione di 200

µl di olio essenziale in 50 ml di acqua distillata e Tween 20 (2%), e per il testimone 50 ml di acqua distillata e Tween 20 (2%).

Per le prove, le piantine sono state spruzzate fino a completo sgocciolamento. successivamente sono



Foto 10 - Particolare di foglia con uova di *T. absoluta*

state poste all'interno dei laboratori del Dipartimento SAF, dell'Università di Palermo , in una stanza ampiamente finestrata ed illuminata da luce naturale.





Foto 11 - Piantine dopo il trattamento

Per ogni prova sono state realizzate 3 ripetizioni, ciascuna con relativo testimone (foto 11).

Con questa metodologia sono stati testati i seguenti prodotti:

- 1) Alloro, (*Laurus nobilis* L) alla concentrazione di 200  $\mu$ l;
- 2) Origano di Spagna (*Corydothymus capitatus* L. *Reichemb. f.*) alla concentrazione di 200  $\mu$ l.

Le osservazioni sono state effettuate dopo 72 ore, rilevando il

numero di uova schiuse sul controllo e sul testimone, e calcolando la percentuale di mortalità.

Un quarto gruppo di prove sperimentali; è stato effettuato per valutare l'influenza sulle deposizioni di *T. absoluta* di due oli essenziali. Tali saggi sono stati effettuati utilizzando delle foglie di pomodoro della varietà "Pizzutello". Per ogni ripetizione è stata preparata una emulsione di 200  $\mu$ l



Foto 12 - Foglie preparate per l'esposizione

di olio essenziale in 50 ml di acqua distillata e Tween 20 (2%), e per il testimone 50 ml di acqua distillata e Tween 20 (2%).

Per le prove, le foglie sono state immerse nella emulsione, successivamente posizionate con il picciolo all'interno di provette di vetro 10x1 cm contenente acqua per il mantenimento del turgore fogliare (foto 12).

I biosaggi hanno previsto il rilascio di una coppia di adulti, prelevati dall'allevamento e trasferiti accuratamente all'interno di . teche in plexiglass dove ospitavano le due foglie, una trattata con olio

essenziale e l'altra con solo bagnante (Tween 20) come testimone e del miele per il nutrimento degli adulti di *T. absoluta*. Le gabbie sono state poste all'interno dei laboratori del Dipartimento SAF, dell'Università di Palermo, in una stanza termo-condizionata (foto 13).



Foto 13 - Esposizione dei trattamenti alla deposizione

Per ogni prova sono state realizzate 40 ripetizioni, ciascuna con relativo testimone.

Con questa metodologia sono stati testati i seguenti prodotti:

- 1) alloro, (*Laurus nobilis* L) alla concentrazione di 200 µl;
- 2) origano di Spagna (*Corydanthus capitatus* L. *Reichemb. f.*) alla concentrazione di 200 µl.

Le osservazioni sono state effettuate dopo 36 ore, rilevando il numero di uova presenti sul controllo e sul testimone, e calcolando la percentuale di repellenza.

## **Analisi statistica**

Per confrontare i diversi oli essenziali nella mortalità per contatto è stata utilizzata la regressione logistica con link function “binomial” Post. Hoc fatta con metodo di tukey;

Per l'effetto insetticida per inalazione sulle larve è stato utilizzato il General linear model (G.L.M.) con “poisson” errors e link function “log”;

L'effetto per contatto sulle uova, è stato utilizzato il General linear model (G.L.M.), con “quasi binomial” error e link function “logit”, usati a causa di over dispersione dei dati;

infine per l'analisi statistica dell'azione deterrente l'ovideposizione è stata utilizzata la

Regressione logistica con “quasi binomial” errors e logit function.

L'ipotesi testata è stata  $H_0 = \log = \emptyset$

Tutte le analisi sono state effettuate con programma statistico R.

## **RISULTATI**

### **EFFETTO INSETTICIDA PER CONTATTO SULLE LARVE DI *T. ABSOLUTA***

#### **Trattamenti effettuati con Torre di Potter**

Dei cinque oli essenziali testati solo tre e precisamente gli oli di basilico, cipresso e alloro hanno avuto azione tossica nei riguardi delle larve di *T. absoluta*. Infatti le prime larve morte si sono registrate già quattro ore dopo il trattamento. In particolare alloro e cipresso hanno fatto registrarla stessa percentuale di mortalità dell'8,3% mentre le larve trattate con olio di basilico hanno avuto una mortalità più bassa e pari al 4,2 %. Nello stesso periodo di tempo nel testimone non si è registrata mortalità di larve.

Considerando la mortalità a sei ore dal trattamento questa è aumentata e precisamente è stata del 12,5 % per olio di cipresso e olio di alloro e del 16,6 % per il basilico. Nelle sei ore successive (osservazione a 12 ore dal trattamento) non si è registrato aumento di mortalità nelle tesi trattate con cipresso e alloro mentre nella tesi trattata con basilico la percentuale di mortalità si è innalzata al 37,5% . Nell'osservazione condotta dopo 24 ore dal trattamento, ancora una volta, non si è registrato aumento di mortalità nella tesi cipresso e alloro mentre nella tesi basilico la mortalità ha raggiunto il 41,6 %. Durante tutta la prova non si è registrata mortalità nel testimone. Il confronto tra le medie effettuato con il metodo di Tukey ha rilevato differenze significative al

livello del 5% solo tra basilico e testimone, basilico-menta , basilico- origano mentre non sono significative le differenze tra basilico e cipresso e basilico e alloro (Fig. 1)

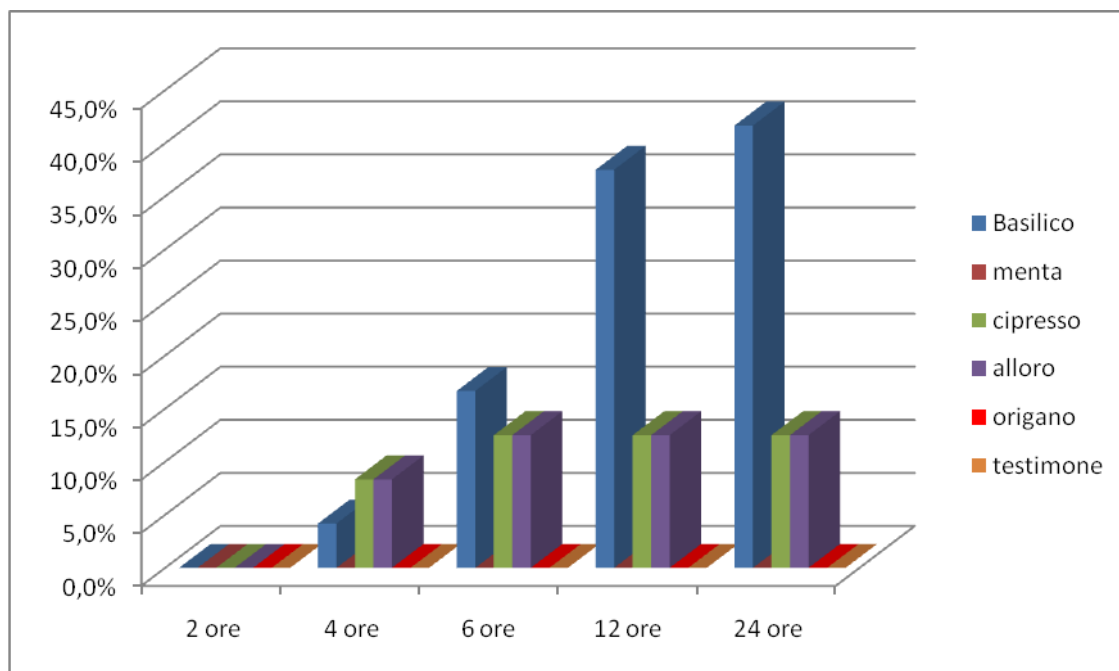


Fig. 1 - Percentuali di mortalità di larve di *T. absoluta* trattate per contatto con i diversi oli essenziali

## EFFETTO INSETTICIDA PER INALAZIONE SULLE LARVE DI *T. ABSOLUTA*

La mortalità di larve di *T. absoluta* ottenuta alle diverse dosi è risultata crescente al crescere delle quantità di olio essenziale impiegate sia riguardo all'origano sia all'alloro. All'analisi statistica le

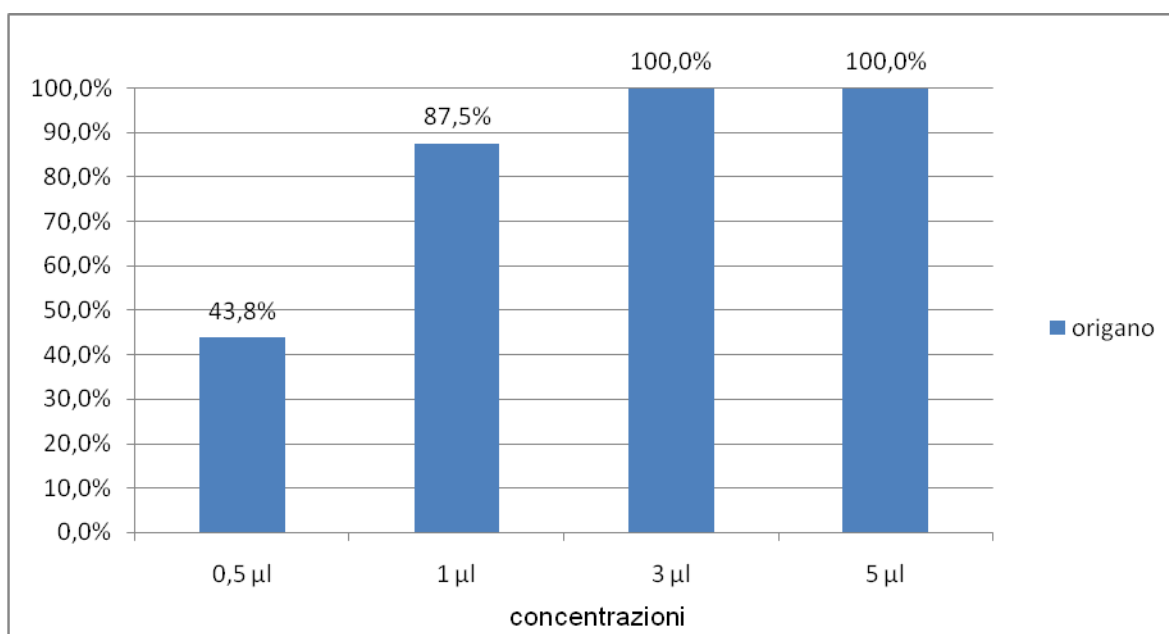


Fig.2 - Percentuali di mortalità di larve di *T. absoluta* alle diverse concentrazioni di olio essenziale di origano testate

mortalità alle diverse dosi sono risultate significative, indicando una correlazione positiva tra dose e mortalità determinata. In particolare l'olio essenziale di origano, ha fatto registrare una mortalità, a 12 ore dal trattamento, pari al 43,8 % alla dose più bassa impiegata di 0,5µl/ml e dell'87,5% alla dose di 1µl/ml. Le dosi di 3 e 5 µl/ml hanno determinato una mortalità del 100% degli individui testati (Fig.2).

Secondo la curva interpolante le diverse mortalità, la dose capace di determinare la mortalità al 100% è stata calcolata in 3,8µl/ml.(Fig.3)

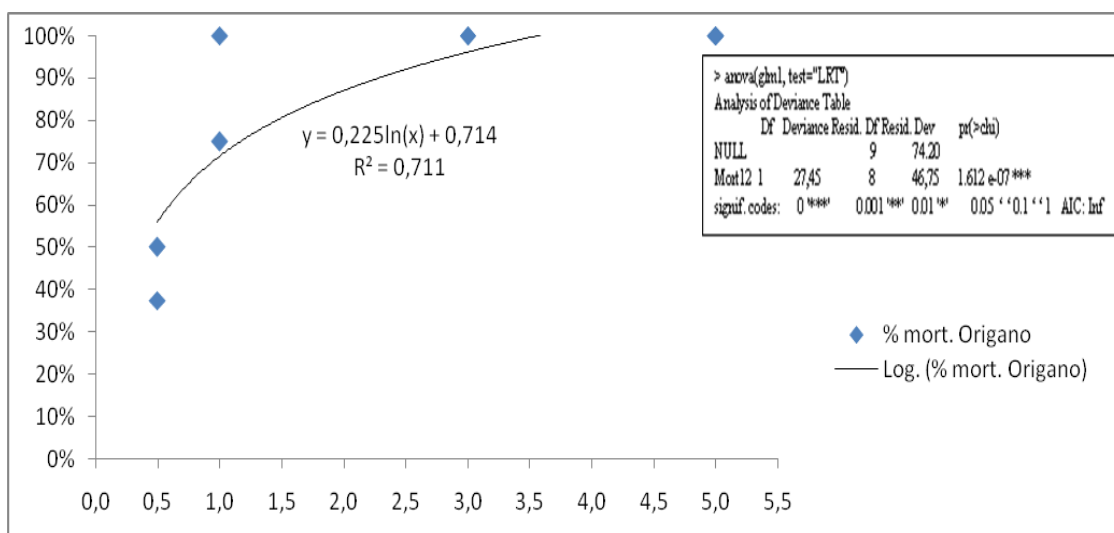


Fig.3 – Curva interpolante i parametri mortalità delle larve e dosi dell’olio, analisi statistica

Per quanto riguarda l’olio essenziale di alloro, (Fig. 4) la dose più bassa alla quale si è registrata mortalità, pari al 13%, è stata di 100µl/ml. Per le dosi successive la mortalità è stata sempre

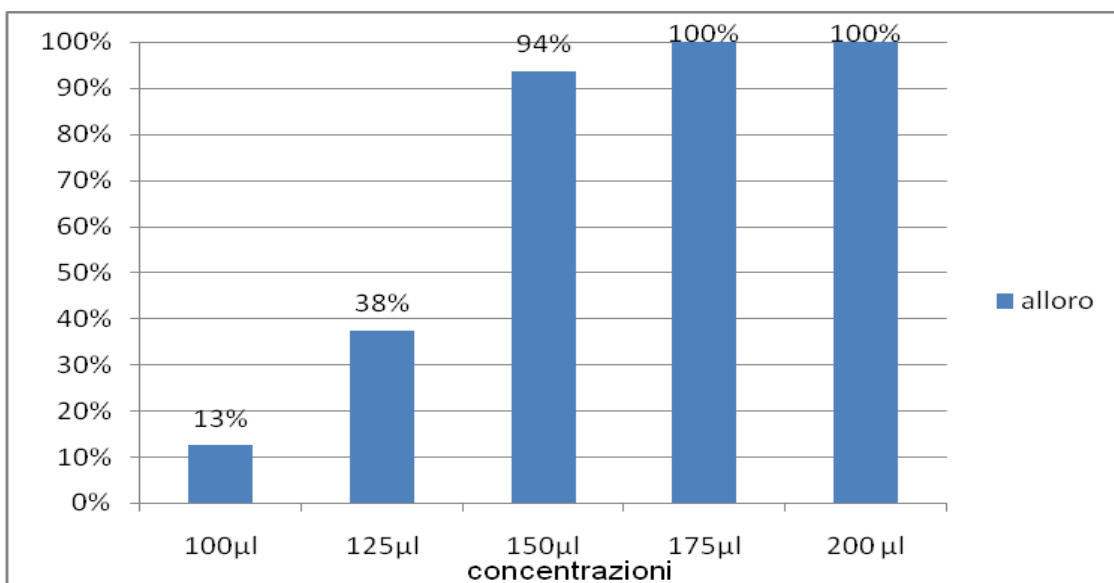


Fig. 4 - Percentuali di mortalità di larve di T. absoluta alle diverse concentrazioni di olio essenziale di alloro testate

crescente con un incremento notevole tra le dosi 125µl/ml è 150µl/ml passando dal 38% al 94%, a 175 µl/ml la mortalità registrata è stata del 100% (Fig.5).

Analogamente per quanto fatto per l'origano la dose letale 100% degli individui è stata calcolata in 183µl/ml.

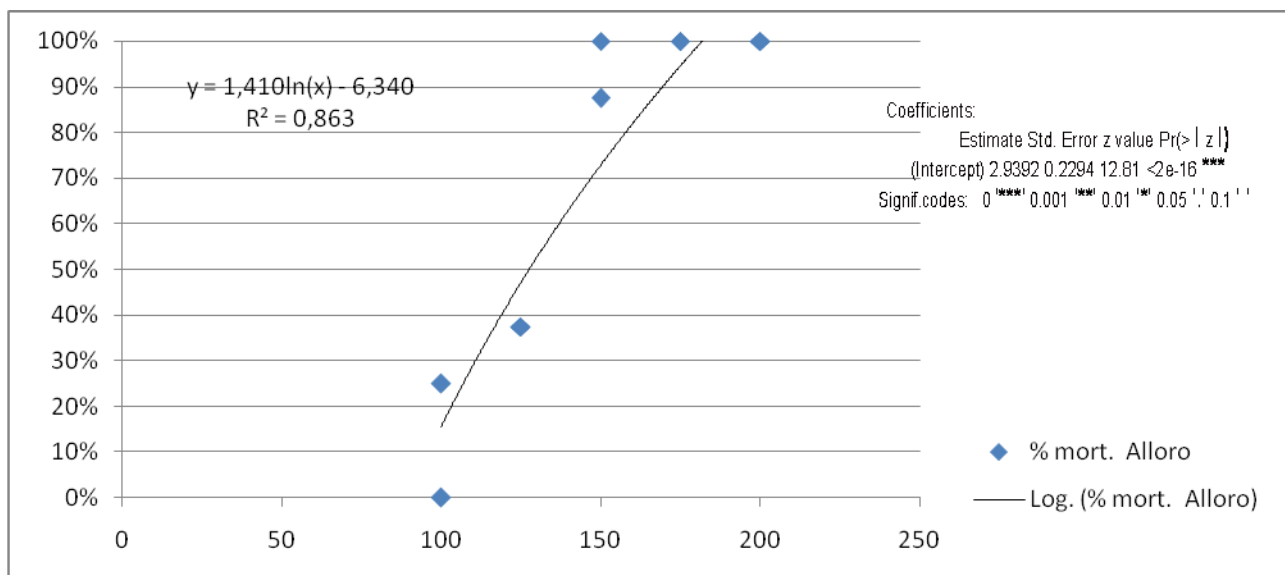


Fig. 5 – Curva interpolante i parametri mortalità delle larve e dosi dell'olio, analisi statistica



## EFFETTO DEI TRATTAMENTI CON GLI OLI ESSENZIALI SULLA SCHIUSA DELLE UOVA DI *T. ABSOLUTA*

L'azione di contatto degli oli essenziali testati sulla schiusa delle uova è stata modesta. Infatti, la percentuale media di schiusa delle uova trattate con l'emulsione di olio essenziale di alloro è stata del 91,67% , mentre con l'origano è stata del 80,89%, mentre nel testimone le uova sono tutte schiuse. Le differenze tra le medie non sono risultate statisticamente significative (Fig. 6).

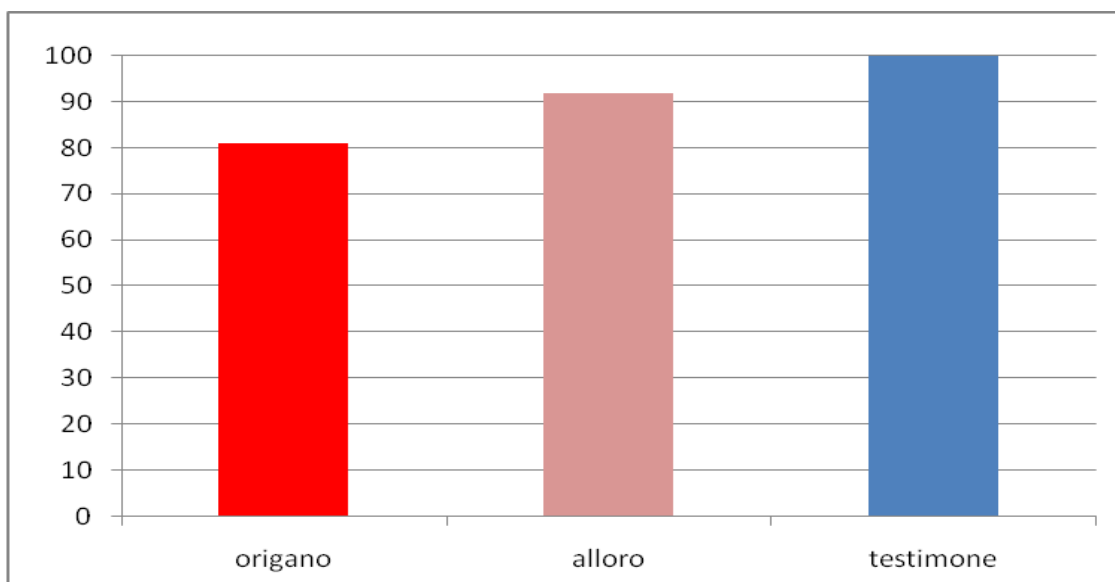


Fig. 6 - Percentuali di schiusa delle uova nei tre trattamenti

## EFFETTO DETERRENTE L'OVIDEPOSIZIONE

Gli effetti dei trattamenti sulla deposizione delle femmine sulle foglie su cui deporre, sono risultati molto marcati per entrambi gli oli testati, infatti nelle tesi che prevedevano il confronto tra piantine trattate con alloro, verso piantine non trattate su un totale di 338 uova deposte, il 90,83% sono state deposte sulle piantine non trattate e il 9,17% sulle piantine trattate (Fig. 7).

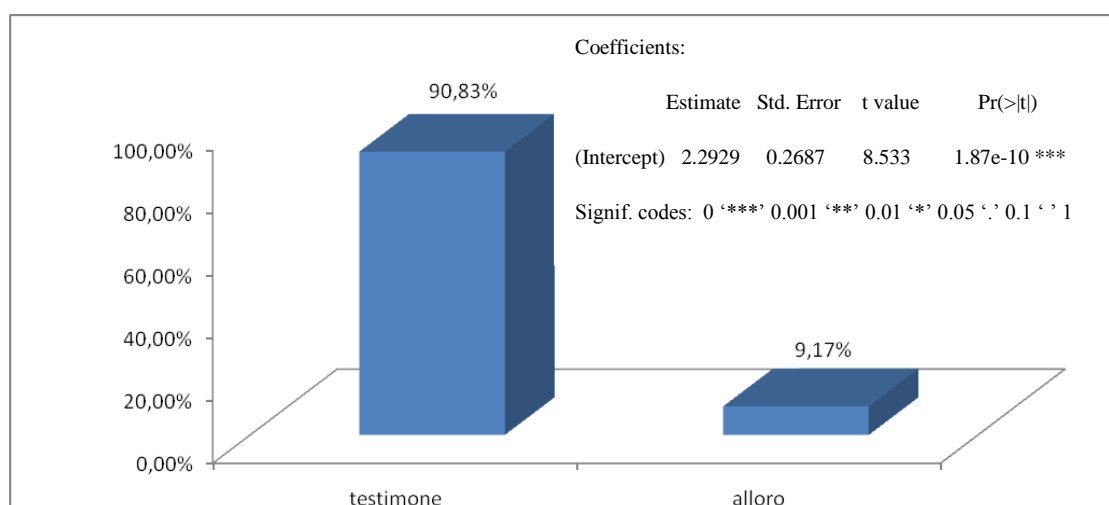


Fig. 7 - Percentuale di uova deposte dopo il trattamento con olio essenziale di alloro

La media di uova deposte per piantina è stata di 7,65 sul testimone e 0,77 sul test. (Fig.8)

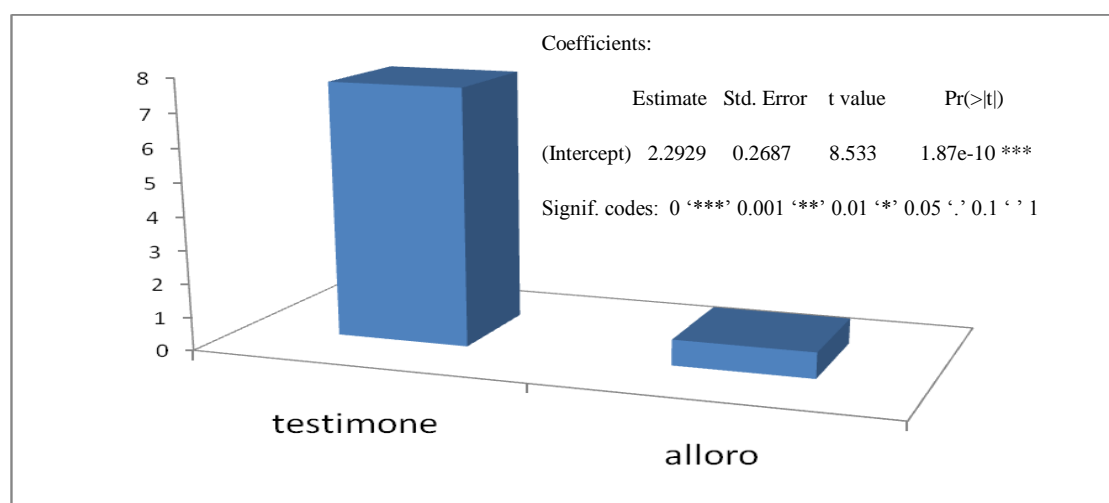


Fig. 8 - Valori medi di uova deposte dopo il trattamento con olio essenziale di alloro

Simile è stata la risposta nel confronto che riguardava le piantine trattate con olio essenziale di origano, in questo caso il numero totale di uova deposte è stato di 398, ripartiti per il 94,97% sulle foglie controllo e il 5,03% sulle foglie trattate (Fig.9). La media di uova deposte per foglia è stata di .9,4 sul testimone e 0,5 sul test (Fig.10).

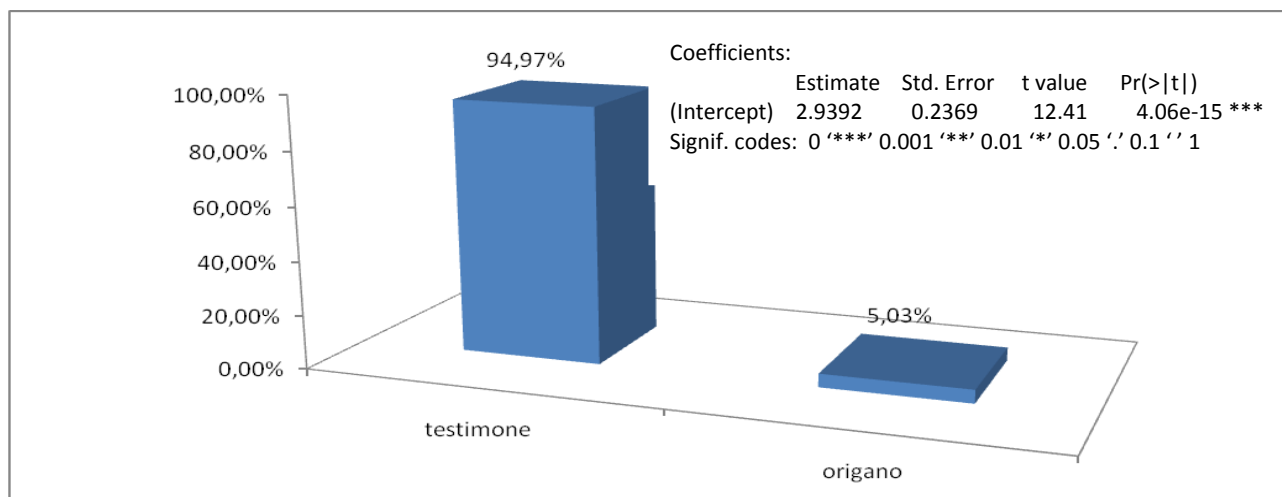


Fig. 9 - Percentuali di uova deposte dopo il trattamento con olio essenziale di origano

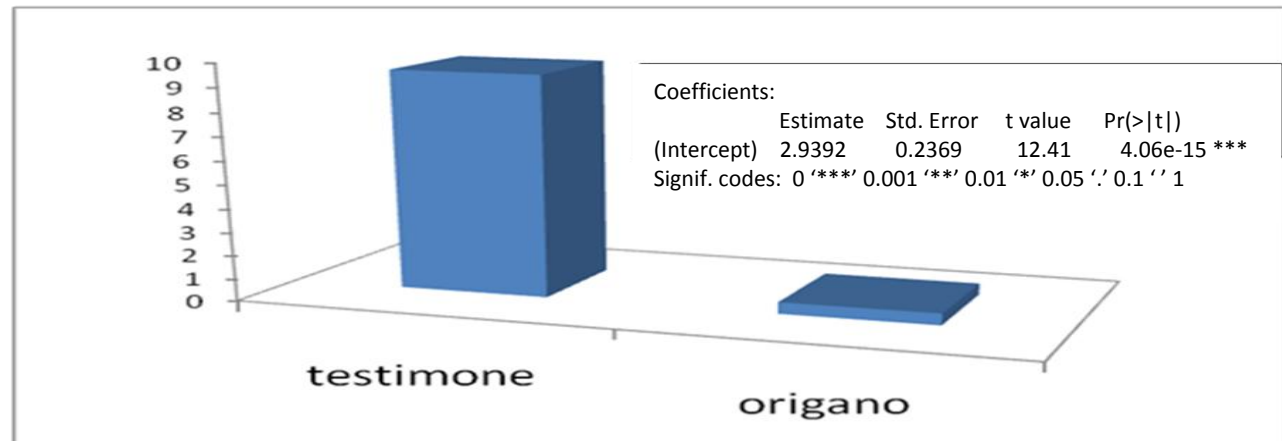


Fig.10 - Valori medi di uova deposte dopo il trattamento con olio essenziale di origano

All'analisi statistica la differenza tra le medie è risultata significativa ad un livello superiore all'1%.

Per entrambi gli oli essenziali impiegati.

## CONCLUSIONI E DISCUSSIONI

Nel nostro studio abbiamo dimostrato che l'attività insetticida per contatto sulle larve, di cinque oli essenziali presi in esame, si è dimostrata dipendente dai diversi OE utilizzati. Le prove condotte in laboratorio hanno rilevato come l'olio essenziale di basilico abbia una maggiore effetto tossico rispetto quello di menta, cipresso, alloro, origano, nei confronti delle larve di *T. absoluta*, determinando nelle prove sperimentali una mortalità del 41,6 %

Nel nostro studio abbiamo dimostrato anche una certa attività insetticida sulle larve per inalazione, distribuendo l'emulsione di olio essenziale di origano e alloro. Tale effetto tossico è in dipendenza della relativa concentrazione dei due oli, permettendo di raggiungere una mortalità del 100% nei confronti degli individui rispettivamente alle dosi di 3,8 $\mu$ /ml per l'origano e di 183  $\mu$ /ml per l'alloro. L'attività tossica esercitata dall'OE potrebbe essere dovuta ad uno dei composti principali di questo OE, il terpinolene. Infatti, la tossicità del terpinolene è stata evidenziata anche in studi effettuati nei confronti di altre specie di insetti; ad esempio, nei confronti della zanzara tigre asiatica, *Aedes albopictus* (Conti et al., 2012), e contro alcuni coleotteri delle derrate alimentari, come *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Wang et al., 2009), *Callosobruchus chinensis* (L.) e *Sitophilus oryzae* (L.) (Park et al., 2003).

La mortalità potrebbe essere dovuta alla presenza di borneolo e 1,8-cineolo come componenti principali degli OE stessi; questi due composti sono già conosciuti come tossici nei confronti di diverse specie di insetti (Rozman et al., 2007).

Per quanto concerne la tossicità per contatto sulle uova indotta dall'OE di origano e alloro nelle prove effettuate in condizioni di semi-campo, entrambi gli oli essenziali si sono rilevati poco tossici, determinando una schiusa del 80.89 % per l'origano e del 91,67%.

Infine le prove condotte in laboratorio per valutare l'effetto deterrente l'ovideposizione delle femmine di *T. absoluta*, degli oli essenziali di alloro e origano hanno mostrato che entrambi gli oli

hanno permesso comunque di raggiungere rispettivamente il 90,83% per l'alloro e il 94,97% per l'origano. Risultati, quindi che hanno evidenziato un'azione molto efficace per entrambi gli oli testati.

In letteratura esistono numerosi esempi di applicazione di oli essenziali di origano e alloro: Papachristos et al. (2000) ha utilizzato gli oli essenziali di alloro e origano testandoli nella loro forma di vapore contro *Acanthoscelides obtectus* (Sai); dai risultati ottenuti si è evidenziato un forte effetto repellente (> 80%), L'analisi della varianza mostra un effetto significativo sulla fecondità e la produzione totale di uova di *A. obtectus*.

Tunc et al. (2000) hanno studiato e valutato l'attività fumigante dell'olio essenziale di origano, contro le uova di due importanti insetti: *T. confusum* e *E. kuehniella*. Dai risultati ottenuti l'olio essenziale di origano ha raggiunto 77% e 89% di mortalità contro *T. confusum* ed *E. kuehniella* rispettivamente, alla dose di 196,9 µl /1000 ml, a 96 h.

Recenti studi effettuati da Cosimi et al. (2009) hanno riguardato l'effetto repellente dell'alloro contro adulti di *S. zeamais* e *C. ferrugineus* e larve di *T. molitor*. I test su *S. zeamais* alle dosi 0,01 e 0,1% a 24 h non hanno mostrato alcun effetto significativo. Su *C. ferrugineus* un significativo effetto repellente è stato ottenuto solo a concentrazione 0,1% e dopo 1 e 5 h di esposizione. Su *T. molitor* l'effetto repellente è stato meno evidente.

Concludendo, i risultati di questo lavoro evidenziano come l'utilizzo di questi oli essenziali possa avere un duplice effetto: indurre un buon livello di mortalità nei confronti delle larve e di evitare la deposizione da parte delle femmine di *T. absoluta*. Nei programmi di controllo integrato contro i (Lepidoptera: Gelechiidae), questa nuova strategia a basso impatto potrebbe ridurre in maniera significativa i costi di gestione fitosanitaria e gli effetti ambientali dannosi riscontrabili nei metodi di lotta convenzionali.

In futuro, saranno necessarie ulteriori ricerche per sviluppare nuove tecnologie in grado di migliorare l'efficacia della distribuzione, in condizioni di pieno campo, nonché per valutare il

potenziale effetto tossico degli oli essenziali derivanti da Lamiaceae e Lauraceae verso gli insetti utili (pronubi ed entomofagi). E' opportuno inoltre, meglio valutare l'attività biologica degli OE in condizioni di pieno campo, essendo nota la loro scarsa stabilità chimica in presenza di aria, luce, umidità ed alte temperature, fattori che spesso causano la rapida evaporazione o degradazione di alcuni loro componenti attivi.

## BIBLIOGRAFIA

- Abadias M., Alegre I., Usall J., Torres R., Vinas I. (2011): “*Evaluation of alternative sanitizers to chlorine disinfection for reducing foodborne pathogens in fresh-cut apple*”. *Postharvest Biology and Technology*. 59: 289-297.
- Anonymous (2005) Whitefly knowledgebase. United States Department of Agriculture, Knowledgebase Retrieved May 29, 2012 from <http://entomology.ifas.ufl.edu/fasulo/whiteflies/wfly0082.htm>
- Burt S. A., Reinders R. D. (2003): “*Antibacterial activity of selected plant essential oils against Escherichia coli O 157:H7*”. *Letters in Applied Microbiology*. 36 (3): 162-167
- Burt S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
- Choi WI, Lee EH, Choi BR, ParkHM, Ahn YJ (2003) Toxicity of plant essential oils to *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *J Econ Entomol* 96(5):1479–1484
- Copping L.G., Menn J.J. 2000. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science* 56, 651–676.
- Cosimi, S. Rossi, E., Cioni, P. L., Canale, A., 2009 – Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from mediterranean plants against stored-product pests: evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Tenebrio molitor* (L.) – *J. Stor. Prod. Res.* 45 (2009): 125-132.
- Dhaliwal, G.S. and Koul, O. (2007) *Biopesticides and Pest Management: Conventional and Biotechnological Approaches*. Kalyani Publishers, New Delhi.
- Dušan F., Marián S., Katarína D., Dobroslava B. 2006. Essential oils—their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicology in Vitro* 20, 1435-1445.
- Gutierrez J., Bourke P., Lonchamp J., Barry-Ryan C. (2009): “*Impact of plant essential oils on microbiological, organoleptic and quality markers of minimally processed vegetables*”. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 10: 195-202.
- Hart H., Craine L. E., Hart D. J., Hadad C. M. (2008): “*Chimicaorganica*”. Zanichelli. 186,199, 399-400.
- Hussain A.I., Anwar F., Nigam P.S., Ashraf M., Gilani A.H. 2010. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(11), 1827-1836.
- Hutchinson S. A. (1971): “*Biological activity of volatile fungal metabolites*”. *Transactions of the British Mycological Society*. Volume 57, Issue 2.

Koul, O., Dhaliwal, G.S. , Marwaha, S.S. and Arora, J.K. (2003) Future perspectives in biopesticides. In O. Koul, G.S. Dhaliwal, S.S. Marwaha and J.K Arora (eds.), *Biopesticides and Pest Management*, Vol.1, Campus Books International, New Delhi, pp. 386–388.

Koul, O. (2005) *Insect Antifeedants*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Koul, O. (2008) Phytochemicals and insect control: An antifeedant approach. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **27**, 1–24.

Isman MB (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu Rev Entomol* 51:45–66

Isman, M.B. and Machial, C.M. (2006) Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. In M. Rai and M.C. Carpinella (eds.), *Naturally Occurring Bioactive Compounds*, Elsevier, BV, pp 29–44

Lambert R. J. W., Skandamis P. N., Coote P., Nychas G. J. E. (2001): “A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol”. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 453-462.

Lanciotti R., Gianotti F., Patrignani F., Belletti N., Guerzoni M.E. , Gardini F. (2004): “Use of natural aroma compounds to improve shelf life and safety of minimally processed fruits”. *Trends in Food Science & Technology*. 15: 201-208.

Lawrence, B.M. and Reynolds, R.J. (2001) Progress in essential oils. *Perf. Flavour.*, **26**, 44–52.

Lopez M.D., Jordan M.J., Pascual-Villalobos M.J. 2008. Toxic compounds in essential oils of coriander, caraway and basil active against stored rice pests. *Journal of Stored Products Research* 44, 273–278.

Lourenc¸ao AL, Alves AC, Fugi CGQ, Matos ES (2008) Outbreaks of *Trialeurodes vaporariorum* (West.) (Hemiptera: Aleyrodidae) under field conditions in the State of Sao Paulo, Brazil. *Neotrop Entomol* 37:89–91

Lucatti AF, Alvarez AE, Machado CR, Gilardon E (2010) Resistance of tomato genotypes to the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (West.) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Neotrop Entomol* 39(5):792–798

Moleyar V. e Narasimham P. (1992): “Antibacterial activity of essential oil components”. *International Journal of Food Microbiology*. 16 (4): 337-342.

Nerio L.S., Olivero-Verbel J., Stashenko E.E. 2010. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology* 101, 372-378.



Nerio L.S., Olivero-Verbel J., Stashenko E.E. 2009. Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). *Journal of Stored Products Research* 45, 212-214.

Obeng-Ofori D., Reichmuth C., Bekele A.J., Hassanali A. 1998. Toxicity and protectant potential of camphor, a major component of essential oil of *Ocimum kilimandscharicum* against four stored product beetles. *International Journal of Pest Management* 44, 203-209.

Ogendo J.O., Kostyukovsky M., Ravid U., Matasyoh J.C., Deng A. L., Omolo E.O., Kariuki S.T., Shaaya E. 2008. Bioactivity of *Ocimum gratissimum* L. oil and two constituents against five insect pests attacking stored food products. *Journal of Stored Products Research* 44, 328-334.

Papachristos, D. P., and D. C. Stamopoulos. "Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Say)(Coleoptera: Bruchidae)." *Journal of Stored Products Research* 38.2 (2002): 117-128.

Park, I.K., Lee, S.G., Choi, D.H., Park, J.D., Ahn, Y.J., 2003 – Insecticidal activities of constituents identified in the essential oil from leaves of *Chamaecyparis obtusa* against *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Sitophilus oryzae* (L.) – J. Stor. Prod. Res. 39, 375-384.

Paster N., Menasherov M., Ravid U., Juven B. 1995. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi-attacked stored grain. *Journal of Food Protection* 58, 81–85.

Pedretti M. (2003): “Chimica e farmacologia delle piante medicinali”. Studio edizioni. 62-64: 66-70.

Perry T, Batterham P, Daborn PJ (2011) The biology of insecticidal activity and resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 41(7):411–422

Rajendran S., Sriranjini V. 2008. Plant products as fumigants for stored-product insect control. *Journal of Stored Products Research* 44(2), 126-135.

Raven P. H., Evert R. F., Eichhorn S. E. (2002): “*Biologia delle piante*”. Zanichelli. 34-39, 797-798.

Rota, María C., et al. "Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils." *Food control* 19.7 (2008): 681-687.

Rozman V., Kalinovic I., Korunic Z. 2007. Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects. *Journal of Stored Products Research* 43, 349-355.

Santos J.P. 2006. Alternatives to chemical control of stored-product insects on small farms in the tropics. Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored Product Protection, 15–18 October 2006, Campinas, Sao Paulo, Brazil. ABRAPOS, Brazil, pp. 663-673.

Şahin F., Güllüce M.; Daferera D., Sökmen A., Sökmen M., Polissiou M., Agar G., Ozer H. 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control* 15(7), 549-557.

Shaaya E., Kostjukovsky M., Eilberg J., Sukprakarn C. 1997. Plant oils as fumigants and contact insecticides for control of stored-product insects. *Journal of Stored Products Research* 33, 7-15.

Soylu E.M., Soylu S., Kurt S. 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia* 161, 119-128.

Tunç I., Berger B.M., Erler F., Dağlı F. 2000. Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored-product insect. *Journal of Stored Products Research* 36, 161-68.

Van Vuuren S.F., Suliman S., Dhorat S., Viljoen A.M. (2007): “*The pharmacological interaction of commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials*”. South African Journal of Botany. 73 (2): 339-40.

Wang, J.L., Li, Y., Lei, C.L., 2009 – Evaluation of monoterpenes for the control of *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motschulsky – Nat. Prod. Res. 23, 1080-1088.